Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

BEGRÜNDET VON **W. RUHLAND** UND **H. WINKLER**

UNTER MITWIRKUNG VON
J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZURICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
R. HARDER-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

L. BRAUNER
MÜNCHEN

E. BÜNNING
TÜBINGEN

56. BAND, 1. HEFT

MIT 52 TEXTABBILDUNGEN UND 1 PORTRÄT

(ABGESCHLOSSEN AM 21. DEZEMBER 1960)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Planta (Berl.)

Preis DM 28.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E.) Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland*, *L. Brauner* und *E. Bünning*

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Die eingereichten Arbeiten sollen 2 Druckbogen (à 16 Druckseiten) in der Regel nicht überschreiten.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an
Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität,
oder an
Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 83 03 01, Fernschreibnummer 01-83 319
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 2 79 01, Fernschreibnummer 04-61 723

56. Band — **Inhaltsverzeichnis** — 1. Heft

Seite

Porträt von Hermann von Guttenberg

Libbert, E., Die enzymatische Auxinbildung aus Tryptophan unter Einfluß eines nativen Inhibitors 1

Kentzer, T., und E. Libbert, Blockade des Gibberellinsäure-Transports in Hypocotylsegmenten durch Trijodbenzoesäure. Zugleich ein neuer Agarblocktest auf Gibberelline. Mit 1 Textabbildung 23

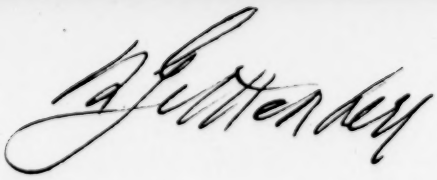
Nuernbergk, E. L., Endogener Rhythmus und CO_2-Stoffwechsel bei Pflanzen mit diurnalem Säurerhythmus. Mit 20 Textabbildungen 28

Höster, H-R., und W. Zimmermann, Die Entwicklung des Leitbündelsystems im Keimblatt von *Pulsatilla vulgaris* mit besonderer Berücksichtigung der Protoxylem-Differenzierung. Mit 19 Textabbildungen 71

Müller-Stoll, W. R., und H. Augsten, Untersuchungen über das Atmungsverhalten der *Hordeum*-Koleoptilen nach Kältebehandlung der Karyopsen 97

Czaja, A. Th., Neue Untersuchungen über die Struktur der partiellen Wandverdickungen von faserförmigen Kollenchymzellen. Mit 12 Textabbildungen 109

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.



Herrn Professor HERMANN VON GUTTENBERG
zum 80. Geburtstag

Planta (Berl.)
Band 56 (1961)

Springer-Verlag
Berlin-Göttingen-Heidelberg

Planta 56, 1—22 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Rostock

DIE ENZYMATISCHE AUXINBILDUNG AUS TRYPTOPHAN UNTER EINFLUSS EINES NATIVEN INHIBITORS*

Von

EIKE LIBBERT

(Eingegangen am 12. September 1960)

Einleitung

Die in der Pflanze vorhandene Menge des Auxins Indol-3-essigsäure (IES) ist für viele Wachstums- und Entwicklungsvorgänge von großer Bedeutung. Sie wird durch IES-bildende und IES-oxydierende Enzymsysteme mitbestimmt. Alle natürlichen Faktoren, die diese Enzymsysteme beeinflussen, können für die Pflanze wichtig sein. Bei Erbsenpflanzen gehört dazu ein Inhibitor, der sich in der neutralen Fraktion ätherischer Extrakte befindet, und der, ohne die IES-Oxydase zu beeinflussen, in vitro das IES-bildende Enzymsystem hemmt (LIBBERT 1958). Wegen der bereits festgestellten physiologischen Rolle von Hemmstoffen derselben ätherischen Fraktion (LIBBERT 1955, 1957, 1959) untersuche ich jetzt den Einfluß des Inhibitors auf das IES-bildende Enzymsystem näher.

Hinweise auf physiologische Bedeutungen nativer Enzyminhibitoren sind bereits vorhanden, z. B. für einen Inhibitor der IES-Oxydase (z. B. GALSTON). Keimungshemmstoffe aus Samenschalen können Inhibitoren von Peroxydasen und Phenoloxydasen (SIEGEL) oder von Amylase (ELLIOTT und LEOPOLD; KÖVES) sein. Der inhibitorhaltige Extrakt, über dessen Wirkung ich hier berichten werde, enthält Substanzen, die bei Adventivwurzelbildung, Wurzelwachstum, Apikaldominanz und Ruhe eine Funktion haben (LIBBERT, l. c.) und hemmt außer der IES-Bildung auch die Amylase (LIBBERT 1959; dort auch weitere Angaben über Funktionen verschiedener Inhibitoren). Hinweise auf einen nativen Inhibitor der IES-Bildung bei *Helianthus* fanden schon HENDERSON und BONNER.

Pflanzen oder pflanzliche Enzympräparate setzen Tryptophan zu IES um. Obwohl das kein definitiver Beweis ist, sieht man Tryptophan als Ausgangsmaterial der IES-Bildung in der Pflanze an. Die Literatur wurde von LARSEN (1951) und GORDON (1954, 1956) besprochen; einige neuere Befunde: v. ABRAMS; TONZIG und TREZZI; LUND; KONISHI; DANNENBURG und LIVERMAN; MELCHIOR (1958). Zwei Reaktionswege

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. HERMANN VON GUTTENBERG in Verehrung zum 80. Geburtstag.

vom Tryptophan zur IES werden diskutiert (s. GORDON 1956): 1. durch oxydative Desaminierung oder wahrscheinlicher durch Transaminierung (GORDON) zur Indol-3-brenztraubensäure (IBrS) und von dort durch oxydative Decarboxylierung zur IES, mit Indol-3-acetaldehyd (IAc) als möglichem Intermediat zwischen Decarboxylierung und Oxydation; 2. durch Decarboxylierung des Tryptophans zum Tryptamin, von dort durch eine desaminierende Monoaminoxydase zum IAc und durch Oxydation zur IES. Weder Tryptamin noch IBrS sind bei höheren Pflanzen als Zwischenprodukte sichergestellt, IAc durch GORDON (1956) wenigstens wahrscheinlich gemacht. Daran mag die Labilität von IBrS und IAc mitschuldig sein. Nach GORDON (1956), ANDREAE (1959) sowie DANNENBURG und LIVERMAN ist bei höheren Pflanzen der Weg über IBrS wahrscheinlicher als der über Tryptamin. Nach CRADY und WOLF führt bei Microorganismen der Weg über Tryptamin; andererseits ist bei *Agrobacterium tumefaciens* als einzigem Organismus nach Tryptophanfütterung das Auftreten von IBrS sehr wahrscheinlich gemacht (KAPER und VELDSTRA), während Tryptamin fehlt. Auch bei Tieren scheint es beide Wege der IES-Bildung aus Tryptophan zu geben (WEISSBACH et al.), wobei der Weg über Tryptamin ein Nebenweg sein soll.

Anlaß zu Zweifeln an der Bedeutung der IES-Bildung aus Tryptophan gaben mehrfach die geringen IES-Ausbeuten (Literatur: BENTLEY). Den höchsten Umsatz (2—3%) erhielt LIBBERT (1960). Die Hauptmenge des inkubierten Tryptophans wird nicht für andere Reaktionen verbraucht, sondern ist nach Versuchsende nachweisbar (HENDERSON und BONNER); das gilt auch für die vorliegende Untersuchung.

Rohenzymextrakt und nativer Inhibitor wurden aus halbetiolierten *Pisum*-Pflanzen gewonnen. Einige Eigenschaften des Enzyms wurden publiziert (LIBBERT 1960). Die benutzte *Pisum-sativum*-Sorte „Senator" enthält weder Indol-3-acetonitril noch reagiert sie darauf, noch setzt sie es in vivo zu IES um (LIBBERT und BALLIN). Überhaupt ist bei *Pisum* nahezu der gesamte Auxingehalt der IES zuzuschreiben (KÖGL und ELEMA). — Nach verschieden langer Einwirkungszeit des Enzymextraktes auf Tryptophan wurden die Reaktion abgebrochen und die enzymatischen Umsetzungsprodukte untersucht.

Methode

Pflanzenmaterial. Enzym und Hemmstoff extrahiert aus wenig belichteten, nicht voll ergrünten Erbsenpflanzen, vgl. LIBBERT 1960.

Gewinnung des enzymhaltigen Extraktes (TE). 7,5 g Erbsensprosse (etwa 2 Wochen alt) in 6,25 ml Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (0,05 mol, p_H 6,8) mit etwas Quarzsand zerrieben, einige Minuten zentrifugiert (3000 U/min), Bodensatz verworfen, überstehende klare Lösung als Enzym (TE) verwendet. Enzym täglich frisch bereitet oder eine Nacht bei $+1^0$ C aufbewahrt. Der Enzymextrakt hat nur minimale IES-Oxydase-Aktivität (LIBBERT 1960).

Gewinnung des hemmstoffhaltigen Extraktes (HS). 15 g Erbsensprosse (etwa 3 Wochen alt) zerschnitten und bei $+1^0$ C etwa 15 Std in 30 ml Äther (peroxydfrei)

extrahiert. Nach Zusatz von 14 ml Aqua dest. Äther im Vakuum bei Zimmertemperatur abdestilliert, wäßrige Lösung filtriert und mit 4 ml $NaHCO_3$ (4,2%) unter 5minütigem Schütteln alkalisiert. Dreimaliges Ausschütteln der nichtsauren Bestandteile mit je 15 ml Äther, wäßriger Rest mit den sauren Bestandteilen verworfen, Äther nach Zusatz zu 5 ml des Reaktionsgemisches im Vakuum abdestilliert. Die ätherlöslichen, nichtsauren Bestandteile aus 15 g Erbsensprossen sind nun in 5 ml wäßriger Lösung enthalten, also 3fach angereichert.

Enzymatische Umsetzung. 4,7 ml Lösung von DL-Tryptophan (Merck; meist 583 ppm = äquimolar 500 ppm IES) in obigem Phosphatpuffer + 0,3 ml TE in 250 ml-Erlenmeyerkolben (große Oberfläche, vgl. LIBBERT 1960). Hemmstoff wie beschrieben der Tryptophanlösung *vor* dem Enzymzusatz zugefügt. Enzymatische Umsetzung 1—24 Std bei + 30° C im Dunkeln. Abbruch der Reaktion durch kurzes Aufkochen, sofortige Aufarbeitung, Einfrieren oder Aufbewahrung bei + 1° C.

Aufarbeitung der Umsetzungsprodukte. Angesäuert auf p_H 4,0 (HCl), 3mal mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten ätherischen Fraktionen oft zur Entfernung von Spuren schlecht ätherlöslicher Substanzen (Tryptophan!) mit Puffer p_H 4,0 gewaschen. Ätherische Fraktion im Vakuum bei Zimmertemperatur zur Trockene gebracht, aufgenommen in 0,5 ml Äther. Wäßrige Fraktion anfangs im Vakuum bei + 35° C zur Trockene, später gefriergetrocknet, aufgenommen in 0,5 ml Methanol.

In einer Reihe von Versuchen wurde nicht bei p_H 4,0, sondern bei p_H 8,8 (NaOH) ausgeschüttelt. Dabei wurden keine Substanzen gefunden, die nicht auch bei p_H 4,0 ausgeschüttelt werden konnten, ausgenommen Tryptamin (das sonst in der wäßrigen Fraktion blieb).

Papierchromatographie. Ätherische und wäßrige Fraktion getrennt aufgetragen auf keilstreifenförmig (MATTHIAS) geschnittenes Papier (Schleicher und Schüll 2043b), aufsteigend chromatographiert, dunkel, Zimmertemperatur. Alle Untersuchungen mit 3 Laufmitteln (in Klammern die Laufzeiten): Isopropanol/NH_3/H_2O = 10/1/1 (18—20 Std); Eisessig/Wasser = 1/3 (6—8 Std), in diesem Laufmittel ist IBrS relativ stabil (BENTLEY et al. 1956); Wasser (3 Std). Trocknung der Chromatogramme mit Kaltluft.

Sprühmittel zur Anfärbung der Indol-Derivate. Salkowski-Reagens (50 ml 35% $HClO_4$ + 1 ml 0,5 mol $FeCl_3$); Ehrlich-Rgs (2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd + 50 ml konz. HCl + 50 ml 96% Äthanol); Nitrit-Rgs (0,5% $NaNO_2$ in 35% $HClO_4$); Ferricyanid-Rgs (50 ml 0,5% $K_3Fe(CN)_6$ + 50 ml konz. HNO_3); Zimtaldehyd-Rgs (100 ml 5 Vol.-% Zimtaldehyd in 96% Äthanol + 5 ml konz. HCl); Ninhydrin-Rgs [für Tryptophan und Tryptamin: 0,5% Ninhydrin in 93 ml Butanol + 7 ml Eisessig; in einigen Fällen die für Tryptamin empfindlichere fluorescenzoptische Variante nach JEPSON und STEVENS aus PROCHÁZKA (1958a): 0,25% Ninhydrin in 90 ml Aceton + 10 ml Eisessig]; Benzidin-Rgs (für Aldehyde: 5 g Benzidin in 100 ml Eisessig); Silbernitrat-Rgs (sofortige Reduktion beim Besprühen nach BENTLEY et al. 1956 spezifisch für Indol-3-brenztraubensäure: 50 ml konz. NH_4OH + 100 ml 1N $AgNO_3$). Gesprüht mit 1 Sprühmittel wurde jeweils $^1/_2$ Chromatogrammstreifen (der Länge nach halbiert). Getrocknet bei 60° C (die Ninhydrin-Variante nach JEPSON und STEVENS bei 90—100° C). Sichtbar gewordene Substanzen sofort und nach 24 Std markiert (Farbwechsel und -intensivierung besonders bei Ehrlich-Rgs), dann unter Ultraviolettlampe die fluorescierenden Substanzen festgestellt, desgl. auch über NH_3-Dämpfen (LINSER und KIERMAYER).

Bonitierung der Farbintensität. Die relativen Mengen der nachgewiesenen Substanzen aus der Intensität der Farbzonen erschlossen. Intensitäten bonitiert; die Intensitätsunterschiede waren groß genug, um auf diese Weise eindeutig beurteilt zu werden. (Verglichen wurden ohnehin nur gleichzeitig durchgeführte Versuche.)

Bonitur: 1 = sehr schwach; 2 = schwach; 3 = mittel; 4 = stark; 5 = sehr stark. In den Tabellen: Mittelwerte aus den Boniturwerten mehrerer Versuche („mittlere Intensitäten").

Abkürzungen. HAc = Eisessig/Wasser-Laufmittel (s. oben); HS = Hemmstoff-Extrakt (s. oben); IA = Indol-3-aldehyd (Indol-3-carboxaldehyd); IAc = Indol-3-acetaldehyd; IAN = Indol-3-acetonitril; IBrS = Indol-3-brenztraubensäure; ICS = Indol-3-carboxylsäure; IES = Indol-3-essigsäure; IPOH = Isopropanol/NH_3/H_2O-Laufmittel (s. oben); Rgs = Reagens; TE = Tryptophan-Enzym-Extrakt (s. oben); TNH_2 = Tryptamin (Indol-3-äthylamin); Trypt = Tryptophan.

Abweichungen von der Methodik werden im Text erwähnt.

Ergebnisse

Alle nach der Enzymeinwirkung auf Trypt nachweisbaren Substanzen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Für eine Trennung der Produkte der enzymatischen Umsetzung von Substanzen, die aus dem TE, dem HS oder der Trypt-Lösung stammen, ist eine chromatographische Untersuchung der letzteren nötig.

I. Chromatographie der Komponenten Tryptophan, Enzym und Hemmstoff

1. Chromatographie von Tryptophan. Trypt bleibt in der wäßrigen Fraktion. Die in den Reaktionsgefäßen enthaltenen je 2,74 mg Trypt geben auf dem Papier sehr breite Zonen (R_f 0,25—0,40 in IPOH; 0,50—0,70 in HAc; 0,25—0,50 in H_2O). Die Farbreaktionen mit Nitrit-, Ferricyanid- und Zimtaldehyd-Rgs sind ähnlich derjenigen mit Salkowski-Rgs (bräunlichgelb, Tabelle 1), mit Ninhydrin-Rgs violett, $AgNO_3$-Rgs wird innerhalb von 24 Std reduziert. Die Fluorescenz nach Besprühen mit Salkowski-, Nitrit- oder Ferricyanid-Rgs ist konzentrationsabhängig. Mit steigender Konzentration sind die Fluorescenzfarben mit Salkowski- oder Nitrit-Rgs: gelb — negativ — hellgelb, über NH_3 graugrüngelb — negativ — violett; mit Ferricyanid-Rgs: gelb — gelb — gelb, über NH_3 blau — gelb — violett. Bei Chromatographie von wenigstens 100 γ Trypt folgen vom Rand her zum Zentrum die verschiedenen Farben aufeinander. Mit Zimtaldehyd-Rgs ist die Fluorescenz purpurn.

Wenn Trypt allein chromatographiert wird, entsteht beim Besprühen eine einheitliche Farbzone. Gleichzeitige Anwesenheit von aktivem oder abgekochtem TE bewirkt eine Zonierung, besonders bei Chromatographie mit IPOH: Zwischen untereinander gleich gefärbten Zonen (etwa mit IPOH: 0,08—0,12, 0,18—0,22, 0,28—0,40) mit schmalen (Richtung Laufmittelfront) bzw. breiten (Richtung Start) Fluorescenzrändern liegen ungefärbte Zonen. Dieser durch den Rohenzymextrakt verursachte Verteilungseffekt kann das Vorliegen mehrerer Substanzen auf dem Chromatogramm vortäuschen.

Mit Ehrlich-Rgs lassen sich noch 0,1 γ Trypt sichtbar machen. 24 Std nach dem Besprühen wird ein bei der IPOH-Chromatographie entstehendes (nichtindolisches?) Abbauprodukt als gelbe, schmale Zone sichtbar (Tabelle 1). Noch 0,02 γ Trypt ergeben diese Zone. Ihre Intensität ist unabhängig von der verwendeten Trypt-Konzentration.

Beim Stehen von Trypt-Lösung (p_H 6,8) unter Versuchsbedingungen entsteht ein spontanes Zerfallsprodukt, das nach Chromatographie mit IPOH oder H_2O mit Salkowski- oder Nitrit-Rgs als graue, nach 2 Tagen (seltener sofort) rosaviolette Zone unmittelbar am oberen Rand der Trypt-Zone sichtbar wird und nicht für ein enzymatisches Umsetzungsprodukt gehalten werden darf.

In der gewaschenen ätherischen Fraktion ist so wenig Trypt, daß es nur mit Ninhydrin- oder $AgNO_3$-Rgs nachweisbar ist, sowie mit Ehrlich-Rgs das erwähnte gelbe Zerfallsprodukt.

2. Chromatographie des Enzym-Extraktes. TE wurde sofort oder nach längerem Stehen (bis zu 24 Std) unter Versuchsbedingungen mit Äther fraktioniert. Tabelle 1 enthält die chromatographisch nachweisbaren Substanzen mit Ausnahme einer Reihe nur mit Ninhydrin nachweisbarer Aminosäuren. Auch Tryptophan ist in geringer Menge im TE enthalten.

Drei gelbe Farbzonen (e1, e2, e3; s. Tabelle 1) erscheinen in der wäßrigen Fraktion beim Besprühen mit Ehrlich-Rgs sofort (also aromatische Amine?: Manning und Galston. Jedenfalls kaum Indolderivate), mit Zimtaldehyd-Rgs nach einigen Stunden, mit Ferricyanid-Rgs nach einigen Tagen. Die kräftigste der 3 Zonen, e1, ist als einzige in allen 3 Laufmitteln zu finden und auch sofort mit Ferricyanid-Rgs (hellblau, erst später gelb) bzw. durch Fluorescenz (Ehrlich-Rgs: olivgrün; Nitrit- und Salkowski-Rgs: bläulichweiß) nachzuweisen. — Der gelbe Farbstoff g (ebenfalls wäßrige Fraktion, s. Tabelle 1) ist mit Salkowski-, Nitrit- und Ferricyanid-Rgs verstärkt (auch fluorescenzoptisch: gelb) sichtbar. Die Farbzone ist beim Laufmittel H_2O am schmalsten und intensivsten und auch mit Ehrlich-Rgs nachweisbar (orange über NH_3).

Von den 5 Fluorescenz-Zonen (Tabelle 1) ist nur f1 charakteristisch. Unbesprüht fluoresciert f1 blau; die Fluorescenz wird durch Ehrlich-Rgs gelöscht und taucht über NH_3 in kräftig fleischrosa Farbe wieder auf. Bei alkalischer Reaktion läßt sich f1 nicht mit Äther aus wäßriger Lösung ausschütteln; f1 ist also sauer. — Zone f2 ist nur mit Salkowski-Rgs sichtbar und verschwindet über NH_3. Zone f3 fluoresciert unbesprüht nur über NH_3, mit Salkowski-Rgs nur ohne NH_3. Zone f4 fluoresciert nach Behandlung mit Salkowski- oder Ferricyanid-Rgs nur so lange, wie der Streifen über NH_3-Dämpfe gehalten wird. Zone f5 ist nur nach Besprühen mit dem Ferricyanid-Rgs zu finden.

3. Chromatographie des Hemmstoff-Extraktes. Der HS enthält nur ätherlösliche, nichtsaure Substanzen. Zwei Substanzen können nachgewiesen werden: die Zonen h1 und h2 (Tabelle 1). Erstere ist in allen Versuchen sehr deutlich. Die charakteristischen Nachweisreaktionen sind: Sofortige intensive Rotfärbung beim Besprühen mit Ferricyanid- oder Nitrit-Rgs, die nach wenigen Minuten verschwindet; sowie mit Salkowski- oder Nitrit-Rgs blaue, über NH_3 augenblicklich gelb (Nitrit-Rgs: gelbgrün) und sehr stark werdende Fluorescenz. Die übrigen Reaktionen sind nicht verläßlich: bräunlichgelbe Färbung mit Salkowski- und Nitrit-Rgs; mit Ferricyanid grau, Fluorescenz blau; Ninhydrin-Rgs: Fluorescenz violett. — Sehr geringe Mengen von h1 sind zuweilen auch im TE nachweisbar, das ja wie der HS aus Erbsenpflanzen extrahiert wurde. — In wäßriger (auch gepufferter) Lösung ist h1 kochfest. Beim Aufkochen in Anwesenheit von TE und Trypt (zum Abstoppen der enzymatischen Umsetzung) wird aber die Fluorescenz-Intensität von h1 sehr herabgesetzt.

Die andere im HS nachweisbare Substanz, h2, ist nur durch ihre Fluorescenz über NH_3 nachweisbar: mit Salkowski-Rgs tiefviolett, mit Nitrit-Rgs hellviolett, ohne Sprühmittel keine Fluorescenz.

II. Chromatographie der enzymatischen Umsetzungsprodukte aus Tryptophan

Die enzymatische Reaktion, die bei Einwirkung von TE auf Trypt stattfindet, wurde nach 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18 oder 24 Std abgebrochen. Eine Übersicht über die Reihenfolge, in der die im Folgenden zu

Tabelle 1. *Aufstellung der R_f-Werte und Farbreaktionen der untersuchten und gefundenen Substanzen*

Synthetische Substanz	Substanz aus TE	Substanz aus HS	Enzym. Produkte aus Trypt	Phase[1]	R_f in Isoprop.	R_f in HAc	R_f in H_2O	Salkowski-Reaktion	Ehrlich-Reaktion[2]	Bemerkungen
Trypt . . .	Trypt			w	0,35	0,65	0,50	bräunlichgelb	violett (blaugrau)	
Trypt . . .				w	0,34	—	—	—	(gelb)	Abbauprodukt aus Trypt bei der Chromatographie
Trypt . . .				w	0,40	—	0,55	—	grau (rosaviolett)	Abbauprodukt aus Trypt in Phosphatpuffer
	e 1			w	0,15	0,80	0,70	—	gelb	
	e 2			w	0,45	—	—	—	gelb	
	e 3			w	0,50	—	—	—	gelb	
	g			w	0,10	0,75	0,60	gelb	—	gelber Farbstoff
	f 1			ä	0,20	—	0,65	Fluorescenz blau	Fluorescenz rosa über NH_3	Fluorescenz blau
	f 2			ä	—	0,80	—	Fluorescenz gelb	—	
	f 3			ä	—	—	0,45	Fluorescenz blau	—	Fluorescenz blau über NH_3
	f 4			w	—	—	0,35	Fluorescenz blau über NH_3	—	
	f 5			w	—	—	0,45	—	—	Fluorescenz blau mit Ferricyanid-Reagens
		h 1		ä	0,85	0,70	0,35	Fluorescenz blau über NH_3 gelb	—	Nitrit- und Ferricyanid-Reagens: rot
		h 2		ä	0,70	—	—	Fluorescenz violett über NH_3	—	

IES			IES	ä	0,45	0,75	0,70	rosa	violett (blau)	
IES			IES	ä	0,35	0,80	0,70	—	gelb	Abbauprodukt aus IES bei der Chromatographie
ICS			ICS	ä	0,35	0,60	0,65	orangerosa	rotviolett	
IA			IA	ä	0,90	0,70	0,40	braunrosa	violett	Benzidin-Reagens: gelb
			Xa	ä	0,85[3]	0,75[3]	0,50	gelbbraun oder rosabraun	violettgrau oder violettbraun	Benzidin- und Ninhydrin-Reagens: negativ
			Xb	ä	—	0,85	0,75	hellbraun	bläulich ?	unregelmäßig
			Xc	ä	—	0,70	—	—	—	rosa Farbstoff
$TNH_2 \cdot HCl$				w	0,80	0,75	0,30	ockergelb	violett	Ninhydrin-Reagens: violett
			Ya (TNH_2)	w	0,80	0,75[3]	—	ockergelb	violett	unregelmäßig
			Yb	w	—	—	0,55	bräunlich	bräunlichrosa	gelber Farbstoff
			Fa	ä	0,85	0,85	0,45	Fluorescenz blau	—	Fluorescenz blau
			Fb	ä	—	0,35	—	Fluorescenz gelb über NH_3	—	Fluorescenz gelb unregelmäßig
			Fc	ä	—	0,50	—	Fluorescenz gelb über NH_3	—	Fluorescenz gelb unregelmäßig
			Fd	ä	0,50	0,40	—	Fluorescenz rot über NH_3	—	
IAN . . .					0,90	0,70	0,40	blaugrau	rosa	
IAAm[4] . .					0,50	0,70	0,65	weinrot	violett (blauviolett)	
Indol . . .					0,85	—	—	rosa	rosa (violett)	
Skatol . .					0,90	—	—	gelborange	blau	
IBrS . . .					—	0,40	0,75 ?	violett	hellgelb (grün)	$AgNO_3$-Reagens: sofort reduziert
IPS[4] . . .					0,50	0,65	0,60	orangegelb	blau	

[1] w = vorhanden in der wäßrigen Phase; ä = vorhanden in der ätherischen Phase. [2] Ehrlichreaktion, in Klammern: Farbwechsel nach 24 Std. [3] Nur bei Rechromatographie, sonst nicht gefunden. [4] IAAm = Indol-3-acetamid; IPS = Indol-3-propionsäure.

Tabelle 2. *Zeitpunkte des ersten Auftretens der Produkte der enzymatischen Trypt-Umsetzung von Beginn der Reaktion an gerechnet*

	Nachweisbar nach Std					
	1	3	6	12	18	24
Identifizierte Substanzen	IA, ICS		IES, TNH_2			
Unbekannte Farbzonen .		Xa, Xb	Yb		Xc	
Fluorescenz-Zonen . . .	Fa			Fb, Fc		Fd

besprechenden Substanzen auftreten, vermittelt Tabelle 2. R_f-Werte und Farbreaktionen vgl. Tabelle 1.

1. Indol-3-essigsäure. IES wurde in der ätherischen Fraktion des enzymatischen Umsetzungsproduktes aus Trypt einwandfrei identifiziert. In allen 3 Laufmitteln sind die R_f-Werte (s. Tabelle 1) identisch mit denen synthetischer IES. Den Chromatogrammen zugesetzte IES liefert mit der enzymatisch erhaltenen eine gemeinsame Farbzone. Auch die Farbreaktionen sind identisch: Tabelle 1, außerdem: Salkowski-Rgs: Fluorescenz über NH_3 blau, wird graugrün; Nitrit-Rgs: rosa, wird braunrosa, Fluorescenz gelb, über NH_3 grünlichgelb; Zimtaldehyd-Rgs: orange, wird gelblich; Ferricyanid-Rgs: lachsfarben, wird rosa, Fluorescenz nur bei großen IES-Mengen, gelb.

Synthetische IES sowie enzymatisch erhaltene ist in allen 3 Laufmitteln nicht völlig stabil; sondern es entsteht 24 Std nach dem Besprühen mit Ehrlich-Rgs eine zweite, gelbe Zone (Produkt mit geöffnetem Indolring ?), vgl. Tabelle 1. Ihre Intensität ist gering und unabhängig von der IES-Konzentration; bei kleinsten IES-Mengen ist nur die gelbe Zone nachweisbar. Im Laufmittel H_2O ist nur der obere Rand der IES-Zone gelb (bei größeren IES-Mengen durch diese überdeckt).

IES tritt nach 6stündiger Einwirkung des TE auf Trypt auf. Bei Verwendung 10mal geringerer Trypt-Konzentration (58,3 ppm) ist nach 6 Std noch keine IES festzustellen. Mit zunehmender Dauer der enzymatischen Umsetzung nimmt die IES-Menge zu [die IES-Oxydaseaktivität des TE ist nach LIBBERT (1960) minimal] bis zur maximalen Ausbeute nach 18 Std, vgl. Tabelle 5 und 6. Eluation der IES-Zone und quantitativer colorimetrischer Test (s. LIBBERT 1960) ergibt dann 20—50 γ IES. Das ist, bezogen auf das vermutlich allein umgesetzte L-Tryptophan (1,37 mg bei Einwaage von 2,74 mg DL-Tryptophan) eine Ausbeute von etwa 2—3%.

Gelegentlich wird IES bereits bei kürzerer Versuchszeit (3—4 Std) nachweisbar. Besonders ist das der Fall bei Versuchen, in denen das ätherische Ausschüttelungsprodukt nach LARSEN (1955) in einen sauren und einen nichtsauren Anteil getrennt wurde. Möglicherweise enthält die ätherische Fraktion des enzymatischen Umsetzungsproduktes ein Material (vielleicht die Substanz Xa, s. S. 10), das beim Ausschütteln mit $NaHCO_3$-Lösung IES liefert.

2. Indol-3-carboxylsäure. ICS wurde in der ätherischen Fraktion bereits nach 1stündiger Enzymeinwirkung auf Trypt mit Sicherheit identifiziert, auch bei Verwendung 10mal geringerer Trypt-Konzentration (58,3 ppm). Die Farbreaktionen sind bei synthetischer und enzymatisch gewonnener ICS identisch: Tabelle 1, außerdem: Salkowski-Rgs: nach 48 Std orangebraun, Fluorescenz orange; Ehrlich-Rgs: Fluorenscenz karminrot; Nitrit-Rgs: lachsfarben, Fluorescenz gelb; Zimtaldehyd-Rgs: schwach orange; Ferricyanid-Rgs: fahlgelb, Fluorescenz nur über NH_3, orangegelb. Mit allen Reagentien wird die Färbung nach dem Besprühen 24 Std lang laufend stärker.

Die R_f-Werte für fermentativ entstandene ICS liegen in IPOH und HAc etwas (0,01—0,05 R_f-Einheiten) niedriger als die synthetischer ICS; nur in H_2O stimmen sie überein. Beim Zusetzen synthetischer ICS zur ätherischen Fraktion werden aber auch die R_f-Werte der synthetischen ICS etwas erniedrigt, und synthetische und fermentativ erhaltene ICS bilden eine gemeinsame Farbzone (Tabelle 1).

Der Zeitverlauf der ICS-Bildung ist beim Vergleich ungleichzeitiger Versuche schlecht festzustellen, da die Mengenunterschiede gering sind (Tabelle 5). Nach 18 Std scheint ein Maximum vorzuliegen. Wenn gleichzeitig angesetzte Reaktionsgemische nach verschiedenen Zeiten abgebrochen werden (Tabelle 6), zeigt sich eine deutliche Zunahme der ICS-Menge von 1 über 3 und 6 bis zu 9 Std. Ebenso wurde eine Abnahme der ICS-Menge nach 24 Std sichergestellt (mittlere Intensitäten aus 6 Versuchen: 18 Std: 2,5; 24 Std: 0,8). ICS wird also im Reaktionsgemisch weiter umgesetzt.

In der Diskussion werde ich zeigen, daß die enzymatisch entstandene ICS (wenigstens zum größten Teil) nicht einer IES-Oxydation entstammt. Wenn die ätherische Fraktion des fermentativen Umsetzungsproduktes nach Larsen (1955) in saure und nichtsaure Fraktion getrennt wird, erscheint ICS im Gegensatz zu IES in beiden Fraktionen! Offensichtlich zerfällt bei der Chromatographie eine nichtsaure Substanz (und zwar die Substanz Xa, s. unten) unter Bildung von ICS.

3. Indol-3-aldehyd. IA kann in der ätherischen Fraktion leicht durch seine Reaktion mit Benzidin-Rgs nachgewiesen werden (Aldehyd-Rgs, reduzierende Gruppen). Die kräftige gelbe Färbung ist für IA unter den Indolderivaten ziemlich spezifisch. Die Reaktionen mit Salkowski- und Ehrlich-Rgs (Tabelle 1) sind weniger empfindlich, so daß IA in den meisten Fällen nur mit Benzidin-Rgs nachgewiesen werden kann. Die R_f-Werte für synthetischen und enzymatisch erhaltenen IA sind identisch (Tabelle 1). Der ätherischen Fraktion zugesetzter synthetischer IA liefert mit dem enzymatisch gewonnenen eine gemeinsame Farbzone.

Sicherlich ist IA die unmittelbare Vorstufe der enzymatisch entstehenden ICS. Belege dafür werden später veröffentlicht. Der zeitliche

Verlauf der IA-Entstehung entspricht auch dem der ICS-Bildung: IA ist nach 1 Std nachweisbar, die Menge nimmt bis zu 9 Std zu (Tabelle 6). Mit längeren Versuchszeiten wurden keine vergleichenden Untersuchungen durchgeführt. Nach 15 Std ist IA jedenfalls noch nachzuweisen.

4. Die unbekannte Substanz Xa. Xa tritt in der ätherischen Fraktion fast regelmäßig auf, aber nur bei Chromatographie mit H_2O. Die Färbung mit Ehrlich-Rgs (Tabelle 1) ist wesentlich intensiver als die Salkowski-Färbung. In manchen Versuchen scheinen sich ICS und Xa gegenseitig auszuschließen; aber auch beim scheinbaren Fehlen von ICS läßt sich nach Salkowski-Behandlung eine geringere ICS-Menge fluorescenzoptisch nachweisen.

Daß Xa wirklich ein enzymatisches Umsetzungsprodukt ist, wird dadurch gezeigt, daß ohne TE-Zusatz (unter eventuellem Zusatz von HS) oder Verwendung von abgekochtem TE weder Xa, noch ICS, IA und (s. unten) Xb entstehen.

Bei Chromatographie der ätherischen Fraktion mit HAc oder IPOH wird Xa nicht gefunden. Xa kann aber nach H_2O-Chromatographie mit Äther eluiert, mit IPOH, HAc oder H_2O rechromatographiert und dann regelmäßig nachgewiesen werden. Hierbei wurde nach dem Eluieren der größte Teil des Äthers im Vakuum entfernt und das Eluat von je 2 Chromatogrammen gemeinsam auf 1 Streifen chromatographiert. Auf diese Weise können die R_f-Werte für Xa in IPOH und HAc festgestellt werden (Tabelle 1).

Bei der Rechromatographie von Xa tritt aber nicht nur Xa selbst auf, sondern ganz eindeutig ICS und IA; das gilt für alle 3 Laufmittel. Da mit Sicherheit nur Xa eluiert wurde, muß diese Substanz relativ instabil sein und beim Chromatographieren teilweise zu ICS und IA zerfallen. Hierdurch findet das Auftreten von IA und ICS bei der Chromatographie des enzymatischen Umsetzungsproduktes aus Trypt seine Erklärung. Im Laufmittel H_2O ist Xa ziemlich stabil, denn bei H_2O-Rechromatographie werden die geringsten ICS-Mengen gefunden. — Wenn ICS eluiert und rechromatographiert wird, findet man nur ICS, niemals Xa oder eine andere Substanz.

Das Fehlen von Xa bei direkter Chromatographie des enzymatischen Umsetzungsproduktes mit IPOH oder HAc wird erklärt durch die geringe Stabilität in diesen Laufmitteln und durch die Überlagerung mit IES in HAc (vgl. Tabelle 1) und mit der aus dem HS stammenden Substanz h 1 in IPOH (bei HS-Zusatz ist sonst am meisten Xa zu finden, s. S. 14).

Xa reagiert neutral. Der nichtsaure Charakter geht bereits aus dem hohen R_f-Wert in ammoniakalischem IPOH hervor. Beim Ausschütteln des enzymatischen Umsetzungsproduktes bei p_H 8,8 lassen sich die-

selben Xa-Mengen nachweisen wie in parallelen, bei p_H 4,0 ausgeschüttelten Ansätzen. — In diesen Versuchen findet sich auch ICS in beiden Fraktionen, IES nur in der sauren (s. oben, S. 9).

Xa ist erstmals nach 3stündiger Einwirkungsdauer des TE nachweisbar und nimmt bis zu 9stündiger Versuchszeit ständig zu (Tabelle 6). Auch nach 15 Std sind noch größere Xa-Mengen nachweisbar. Nach 1 Std ist offenbar so wenig Xa vorhanden, daß nach dem teilweisen Zerfall zu IA und ICS keine nachweisbaren Mengen übrig bleiben.

Xa reagiert weder mit dem Benzidin- noch mit dem Ninhydrin-Rgs. Zur Sicherstellung dieses Befundes wurde die Xa-Menge durch Vereinigung der ätherischen Fraktionen aus 8 Reaktionsgefäßen auf 1 Chromatographiestreifen 8fach überhöht. Als Ninhydrin-Rgs wurde hier auch die Variante von JEPSON und STEVENS (s. Methode) verwendet.

5. Die unbekannte Substanz Xb. Xb ist eine Zone, die gelegentlich bei Chromatographie der ätherischen Fraktion mit HAc oder H_2O erscheint (Tabelle 1). Das früheste Auftreten wird nach 3 Std Versuchszeit beobachtet; das unregelmäßige Vorkommen zeigt sonst keine Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Die Zone ist meist so schwach (besonders mit Ehrlich-Rgs), daß die Farbqualität nicht eindeutig zu bestimmen ist. Es ist nicht sicher, ob die beiden als Xb bezeichneten Zonen bei Chromatographie mit HAc bzw. H_2O identisch sind. Eine Rechromatographie wurde wegen des sporadischen Auftretens und der minimalen Intensität nicht versucht.

Daß Xb wirklich ein Produkt der enzymatischen Trypt-Umsetzung ist, geht aus den auf S. 10 geschilderten Versuchen hervor. Xb könnte ein Zwischenprodukt der IES-Bildung sein, das sehr schnell umgesetzt wird und sich deshalb nie in größerer Menge anreichert.

6. Der unbekannte Farbstoff Xc. Der rosa Farbstoff Xc (Tabelle 1) ist nur nach 18—24stündiger Einwirkung von TE auf Trypt in der ätherischen Phase nachweisbar. Zweifellos handelt es sich um *kein* Zwischenprodukt der enzymatischen IES-Bildung. — Wenn man IBrS unter denselben Versuchsbedingungen chromatographiert, kommt bei demselben R_f-Wert ein gleicher rosa Farbstoff vor (unveröffentlicht).

7. Die Zone Ya (Tryptamin). Mit TNH_2 komme ich zur Besprechung der Indolderivate aus der wäßrigen Fraktion; denn TNH_2 ist aus saurer wäßriger Lösung (p_H 4,0) nicht mit Äther ausschüttelbar. Die Reaktion mit Ninhydrin-Rgs, besonders die Variante von JEPSON und STEVENS (s. Methode; blaugrüne Fluorescenz) ist charakteristisch, ebenso die intensiv gelbe, später grün werdende Ehrlich-Farbe über NH_3-Dämpfen. Beide Färbungen, sowie auch die mit Salkowski- und Ehrlich-Rgs (Tabelle 1), treten auch mit enzymatisch entstandenem TNH_2 auf, wenn auch die Ninhydrin-Reaktion sehr schwach ist.

TNH_2 kann in der wäßrigen Fraktion nur bei Chromatographie mit IPOH nachgewiesen werden. R_f-Werte von synthetischem und

enzymatisch erhaltenem TNH_2 stimmen überein (Tabelle 1). Beim Laufmittel H_2O muß TNH_2 von der Trypt-Zone (R_f 0,25—0,50 bei den vorhandenen großen Mengen) überdeckt sein; beim Laufmittel HAc scheint das auch der Fall zu sein: Die großen Trypt-Mengen laufen bis R_f 0,70, und mit einer Verzögerung der Laufgeschwindigkeit des TNH_2 durch die großen Trypt-Mengen ist zu rechnen.

Auch bei Chromatographie mit IPOH wird TNH_2 recht unregelmäßig gefunden. Bei Eluation der TNH_2-Zone mit Wasser oder Methanol und Rechromatographie im selben Laufmittel erscheint außer TNH_2 eine zweite Zone (R_f 0,50), die mit Ehrlich-Rgs schwache gelbe, mit Salkowski-Rgs keine Reaktion ergibt, offenbar ein Produkt mit aufgespaltenem Indolring. Die Herkunft dieser Zone ist unklar (bei Chromatographie von synthetischem TNH_2 ist sie nicht zu finden).

Bei Rechromatographie der eluierten TNH_2-Zone in HAc erweisen sich die R_f-Werte von enzymatisch erhaltenem und synthetischem TNH_2 als identisch (Tabelle 1). In H_2O wurde nicht rechromatographiert. — Aus alkalischer Lösung läßt sich synthetisches TNH_2 mit Äther ausschütteln; dasselbe gilt auch für das enzymatisch erhaltene TNH_2.

Aufgrund der R_f-Werte in 2 Laufmitteln, der Farbreaktionen und der Möglichkeit, die Substanz aus alkalischer, aber nicht aus saurer Lösung mit Äther auszuschütteln, halte ich die Identifizierung als Tryptamin für ziemlich sicher. Auf jeden Fall ist die Substanz ein enzymatisches Produkt aus Tryptophan; läßt man TE allein, Trypt allein, HS allein oder Trypt + HS unter Versuchsbedingungen stehen, ist kein TNH_2 nachweisbar.

Der zeitliche Verlauf der TNH_2-Bildung ist wegen des sporadischen Auftretens der Substanz unsicher. Die 2 Versuchsserien der Tabelle 3 vermitteln den Eindruck eines Intensitätsanstieges bis zur 18. Stunde.

Tabelle 3. *Zeitlicher Verlauf des Auftretens der Zone Ya (TNH_2) in Reaktionslösungen Trypt + TE + HS*

Die Versuche mit unterschiedlicher Zeitdauer wurden gleichzeitig angesetzt. — Zahlen: Mittlere Intensitäten aus 4 bzw. 5 Versuchen.

Versuchsserie	3 Std	6 Std	9 Std	12 Std	15 Std	18 Std	24 Std
1	0,0	0,5	0,5	1,5	—	—	—
2	—	—	—	0,2	1,0	2,0	1,6

8. Der unbekannte Farbstoff Yb. Yb ist ein schwach gelber Farbstoff der wäßrigen Fraktion, der nur mit H_2O als Laufmittel nachgewiesen wurde (Tabelle 1). Die Farbintensität wird durch Ehrlich-Rgs (bräunlich) und noch mehr durch Salkowski-Rgs (bräunlichrosa) erhöht. Yb liegt oft innerhalb der Trypt-Zone und ist dann nur vor dem Besprühen

nachzuweisen sowie unmittelbar danach, da die Farbreaktion von Yb (im Gegensatz zu Trypt) sofort sichtbar wird.

Yb tritt nur in Reaktionsgemischen aus Trypt + TE (nicht in TE oder in Trypt allein, auch nicht bei 24stündigem Stehen unter Versuchsbedingungen) auf, und zwar erstmals nach 6stündiger Versuchszeit, und nimmt bis zur größten untersuchten Versuchsdauer laufend zu (Tabelle 4). Yb läßt sich mit Methanol oder H_2O eluieren und rechromatographieren und hat dann (im selben Laufmittel) denselben R_f-Wert. Wegen seines Farbstoffcharakters (und aus anderen Gründen, s. Diskussion) halte ich Yb nicht für ein Intermediärprodukt der IES-Bildung aus Trypt.

Tabelle 4. *Zeitlicher Verlauf des Auftretens der Zone Yb in Reaktionslösungen Trypt + TE*

Die Versuche mit unterschiedlicher Zeitdauer wurden gleichzeitig angesetzt. — Zahlen: Mittlere Intensitäten aus 3 bzw. 4 Versuchen.

Versuchsserie	3 Std	6 Std	9 Std	12 Std	15 Std	18 Std	24 Std
1	0,0	0,3	0,7	1,7	—	—	—
2	—	—	—	1,0	1,3	1,5	2,0

9. Die Fluorenseenz-Zonen. Nur durch Fluorescenz nachweisbare Umsetzungsprodukte des Tryptophans sind nur in der ätherischen Fraktion (Tabelle 1). Sie entstehen alle durch Einwirkung von TE auf Trypt, nicht beim 18stündigen Stehen von Trypt, TE oder HS allein unter Versuchsbedingungen, auch dann nicht, wenn dem Trypt abgekochtes TE zugesetzt wird.

Fa (blau) ist regelmäßig zu finden. Die Fluorescenz wird stärker nach Besprühen mit Salkowski-, Nitrit- oder Ferricyanid-Rgs und verschwindet über NH_3. Fa ist neutral, wie aus dem hohen R_f-Wert in ammoniakalischem IPOH hervorgeht und aus Fraktionstrennungen, die mit der ätherischen Fraktion nach Larsen (1955) vorgenommen wurden. Fa tritt schon nach 1stündiger TE-Einwirkung auf; eine Abhängigkeit zwischen Versuchsdauer und Intensität ist nicht nachzuweisen.

Die Zonen Fb und Fc sind nur nach Chromatographie mit HAc nachzuweisen, aber nicht regelmäßig. Die gelbe Fluorescenz verschwindet mit Salkowski-Rgs, taucht aber über NH_3 wieder auf. Bei Versuchen von kürzerer Dauer als 12 Std werden beide nicht gefunden.

Fd ist erst nach 24stündiger Versuchszeit zu finden und auch dann noch unregelmäßig. Die nach Besprühen mit Salkowski-Rgs schwach gelbe Fluorescenz wird über NH_3 intensiv rot. Ob die Substanz auch ohne Anwendung eines Sprühmittels fluoresciert, wurde nicht untersucht.

III. Der Einfluß von Hemmstoff-Extrakt auf die enzymatische Umsetzung

In Parallelansätzen wurde einem Teil des Reaktionsgemisches (Trypt + TE) Hemmstoff zugesetzt, einem anderen Teil nicht. Nur solche Versuche, bei denen HS-haltige und -freie Enzymansätze gleichzeitig erfolgten, werden im Folgenden berücksichtigt.

Tabelle 5. *Einfluß des Zusatzes von HS zum TE auf die Ausbeute an IES und ICS*

Die Versuchsserien mit unterschiedlicher Zeitdauer wurden ungleichzeitig durchgeführt. Zahlen: Mittlere Intensitäten aus 6—12 Versuchen mit allen 3 Laufmitteln.

		Versuchsdauer in Stunden								
		1	2	4	6	9	12	15	18	24
IES	ohne HS	0,0	0,0	0,0	1,5	2,3	3,8	4,5	4,8	3,6
	mit HS	0,0	0,0	0,0	0,1	1,1	1,9	2,8	3,3	2,6
ICS	ohne HS	1,2	1,2	0,5	1,0	0,5	0,8	0,9	1,3	0,2
	mit HS	2,3	2,4	2,2	2,2	2,0	2,0	2,2	2,8	1,0

Der Einfluß des HS auf das Enzym wird in Tabelle 5 und 6 als verminderte IES-Ausbeute deutlich. Das ist ein regelmäßig in allen 3 Laufmitteln und nach jeder Versuchsdauer auftretender Effekt.

Die Verringerung der Farbintensität beruht nicht auf Interferenz des ätherischen Pflanzenextraktes mit der Salkowski- und der Ehrlich-Reaktion. Nach Papierchromatographie synthetischer IES unter HS-Zusatz wird die Farbintensität ganz leicht vermindert, jedoch nicht im Entferntesten so sehr wie durch HS-Zusatz zum TE. Eine stärkere Interferenz ist auch nicht zu erwarten: Es müßte dann die interferierende Substanz in allen 3 Laufmitteln denselben R_f-Wert besitzen wie IES. Dem enzymatischen Umsetzungsprodukt *nach* Abbruch der enzymatischen Reaktion (Aufkochen) zugesetzter HS wirkt auch nicht intensitätsvermindernd.

Tabelle 6. *Einfluß des Zusatzes von HS zum TE auf die Ausbeute an IES, Xa, ICS und IA*

Die Versuche mit unterschiedlicher Zeitdauer wurden gleichzeitig angesetzt. Zahlen: Mittlere Intensitäten aus 8 Versuchen (für IES, Xa und ICS nach Ehrlich-, für IA nach Benzidin-Reaktion); Laufmittel H_2O.

		Versuchsdauer in Stunden			
		1	3	6	9
IES	ohne HS	0,0	0,0	1,6	4,5
	mit HS	0,0	0,0	0,0	2,4
Xa	ohne HS	0,0	0,0	0,5	1,5
	mit HS	0,0	0,9	1,6	3,0
ICS	ohne HS	0,3	0,5	1,5	1,6
	mit HS	1,6	2,9	3,0	3,0
IA	ohne HS	0,4	0,3	1,6	1,9
	mit HS	2,4	2,8	2,5	3,0

ICS verhält sich entgegengesetzt: Bei HS-Zusatz zum TE ist die Ausbeute während der ganzen 24stündigen Versuchszeit erhöht (Tabelle 5 und 6). Ohne HS ist oft keine ICS nachweisbar, mit HS immer. Auch IA und Xa entstehen in größerer Menge, wenn die enzymatische Reaktion bei Gegenwart von HS abläuft (Tabelle 6). Die gleichsinnige Veränderung der Ausbeuten an Xa, ICS und IA unterstreicht die Ansicht, daß die nach der Chromatographie nachweisbaren Produkte IA und ICS durch Spontanzerfall des instabilen Materials Xa entstehen (s. S. 10).

Man kann nach diesen Ergebnissen annehmen, daß der endogene HS einen zwischen Xa und IES gelegenen Teilschritt der enzymatischen IES-Bildung aus Trypt blockiert. Die IES-Bildung geht dadurch

zurück; und das nur noch unvollkommen umgesetzte Xa sowie dessen spontane Zerfallsprodukte IA und ICS reichern sich an. (Die ohnehin geringe IES-Oxydation wird durch HS nicht beeinflußt: LIBBERT 1958 sowie unveröffentlichte papierchromatographische Untersuchungen.)

Auch hier wird (wie bei IES) eine reale Konzentrationsänderung und nicht nur eine Farbintensivierung durch Substanzen des ätherischen Extraktes erzielt. Das wird (wie für IES) dadurch gezeigt, daß HS-Zusatz *nach* Abbruch der enzymatischen Reaktion keine Erhöhung der Farbintensität der ICS-, der IA- und der Xa-Zone verursacht. In Reaktionsgefäßen ohne Trypt, nur mit TE + HS, entsteht unter Versuchsbedingungen weder Xa nach ICS, noch IA. Dadurch wird unter anderem auch die Möglichkeit ausgeschlossen, daß im ätherischen HS-Extrakt nichtsaure Indolderivate enthalten seien, die durch TE zu ICS, IA oder Xa umgesetzt würden und dann eine erhöhte Ausbeute aus Trypt vortäuschten. Auch wenn Trypt + HS (ohne TE) bis 18 Std unter Versuchsbedingungen stehen, sind ICS, IA und Xa nicht nachzuweisen.

Tabelle 7. *Einfluß des Zusatzes von HS zum TE auf die Ausbeute an TNH_2, Xb und Yb*

Zahlen: Mittlere Intensitäten aus allen TNH_2- bzw. Xc-liefernden Versuchen, die gleichzeitig HS-haltige und HS-freie Reaktionsgefäße umfaßten; für Yb: Mittlere Intensitäten aus 8 Versuchen.

		Salkowski-Reagens	Ehrlich-Reagens	Eigenfarbe
TNH_2	ohne HS	0,3	1,0	—
	mit HS	1,7	2,7	—
Xb	ohne HS	0,4		—
	mit HS	1,1		—
Yb	ohne HS	2,6	2,0	1,0
	mit HS	1,5	1,3	1,0

Die beschriebenen Einflüsse des ätherischen HS-Extraktes auf die Ausbeuten an IES, ICS, IA und Xa sind in jedem Falle Effekte der ätherisch extrahierten Substanzen, nicht Wirkungen etwaiger im Reaktionsgemisch verbliebener Ätherspuren (vgl. auch LIBBERT 1958) oder Folgen des beim Abdestillieren des Äthers vorgenommenen Evakuierens (eventueller O_2-Mangel!): Verwendung reinen Äthers anstelle eines ätherischen HS-Extraktes hat keinen Effekt auf die enzymatische Ausbeute an IES, ICS, IA und Xa.

Auch die Ausbeute an TNH_2 wird durch den HS-Zusatz erhöht (Tabelle 7). Mit diesem Ergebnis steht folgender Befund in Einklang: In Reaktionsgefäßen mit TE + HS (ohne Trypt) zeigen sich nach 18stündigem Stehen unter Versuchsbedingungen nicht selten TNH_2-Spuren, die offenbar aus den im TE vorhandenen Trypt-Spuren (S. 5) enzymatisch entstehen, während ohne HS-Zusatz diese TNH_2-Bildung ausbleibt. Die möglichen Zusammenhänge zwischen TNH_2- und Xa-Anreicherung werden in der Diskussion besprochen.

Auch die Ausbeute des nur sporadisch gefundenen Zwischenproduktes Xb scheint durch den HS gesteigert zu sein (Tabelle 7); doch möchte ich das wegen der (gemessen am geringen Effekt) kleinen Zahl der Versuche (9) nicht als gesichert bezeichnen.

Die Ausbeute an Yb wird bei HS-Anwesenheit offenbar wie die IES-Ausbeute vermindert (Salkowski- und Ehrlich-Rgs: Tabelle 7). Auf die Intensität der schwachen Eigenfarbe von Yb hat HS dagegen keinen

Effekt; aber auch die Intensitätsänderung der Substanz Yb mit der Zeit (Tabelle 4) ist anhand der Eigenfarbe nicht zu erkennen. Es ist kaum möglich, daß der HS nur mit den Nachweis-Reaktionen interferiert, da alle Substanzen des HS-Extraktes im Gegensatz zu Yb in der ätherischen Fraktion bleiben. Vermutlich ist die Eigenfarbe so gering, daß sich Mengenunterschiede nicht bemerkbar machen.

Auf die Intensität des rosa Farbstoffes Xc und der 3 Fluorescenzzonen Fa, Fb und Fc sowie anscheinend auch Fd (wegen des geringen Interesses dieser Substanz nicht näher untersucht) hat HS-Zusatz zum TE keinen Effekt. Sicher haben diese Zonen nichts mit der Trypt-Umsetzung zu IES zu tun.

Diskussion

Die Einwirkung eines halbgereinigten, IES-oxydierenden Enzympräparates aus Weißkohl auf Trypt ergibt 2 Substanzen: IA und ein unbekanntes Produkt (MELCHIOR 1958). Beim Umsatz markierten Tryptophans in vivo in Wassermelonen werden angeblich 5-OH-Trypt, IBrS, TNH_2, IAN und IA gefunden (DANNENBURG und LIVERMAN); die Identifizierung ist aber unsicher, die von IBrS unrichtig (KAPER und VELDSTRA). Nach einer kurzen Mitteilung von LIVERMAN und DANNENBURG wird in *Avena*-Koleoptilen markiertes Trypt in vivo zu IBrS (?), IAN und IES umgesetzt.

Der in der vorliegenden Arbeit erbrachte Nachweis von *Tryptamin* als enzymatisches Produkt aus Trypt beweist nicht die Rolle von TNH_2 als Intermediärprodukt der IES-Bildung aus Trypt. Darüber sollen später zu veröffentlichende Versuche Auskunft geben. Bisher ist die Teilnahme von TNH_2 an der IES-Bildung weder bewiesen noch wahrscheinlich (GORDON 1954, 1956).

Ein Hinweis auf *Indol-3-brenztraubensäure* als Intermediärprodukt der IES-Bildung aus Trypt ist der Befund, daß Keto-Reagentien diesen Prozeß blockieren (WILDMAN, FERRI und BONNER). KAPER und VELDSTRA fanden nach Papierchromatographie des Kulturfiltrats Tryptgefütterter Bakterien dasselbe Zerfallsspektrum wie bei Chromatographie synthetischer IBrS. Das ist der einzige papierchromatographische Nachweis von IBrS in lebendem Material. Die übrigen Angaben müssen nach den Ergebnissen von BENTLEY et al. (1956) falsch sein.

Auch in meinen Versuchen wird IBrS nicht gefunden. Das kann mit der Instabilität dieser Substanz erklärt werden. Schon beim Ausschütteln aus wäßriger Lösung mit Äther zerfällt IBrS (unveröffentlicht). Ebenso zerfällt in meinen Versuchen etwa 40% des im enzymatischen Umsetzungsprodukt direkt colorimetrisch nachweisbaren Materials beim Ausschütteln mit Äther (LIBBERT 1960). Vielleicht handelt es sich um IBrS? Die Hauptzerfallsprodukte der IBrS unter den vorliegenden Bedingungen

(ICS, IES und IA: unveröffentlicht; daneben ein der Zone Xc entsprechender Farbstoff) treten in meinen Versuchen ja auf.

Das *neutrale Intermediärprodukt Xa* ist mit keiner der Substanzen identisch, die bisher als Intermediärprodukte der IES-Bildung diskutiert wurden, vielleicht aber mit einem unbekannten Produkt der Enzymeinwirkung auf Trypt (R_f 0,83 in IPOH/NH_3/H_2O = 80/5/15; Salkowski-Rgs rotbraun: MELCHIOR 1958) oder mit einer in vivo aus Trypt entstehenden neutralen Substanz (R_f 0,81 in IPOH/NH_3/H_2O = 8/1/1 und 0,54 in H_2O; Ehrlich-Rgs blau: DANNENBURG und LIVERMAN).

Mit *Indol-3-acetonitril* oder *Indol-3-acetamid* ist Xa nicht identisch: Die R_f-Werte und Farbreaktionen sind verschieden (Tabelle 1). Die verwendete Erbsensorte enthält kein IAN und setzt es weder in vivo (LIBBERT und BALLIN) noch in vitro (unveröffentlicht) zu IES um.

Angaben über papierchromatographische Nachweise von *Indol-3-acetaldehyd* sind wegen der Instabilität der Substanz und ihrer rapiden Umsetzung zu IES vorsichtig aufzunehmen (BENTLEY). In meinen Versuchen ist IAc papierchromatographisch nicht nachweisbar; denn IAc reagiert als Aldehyd mit Benzidin-Rgs (nach SEN rotviolett), und ich finde nur eine Benzidin-positive Substanz (gelb), nämlich IA. Xa ist Benzidin-negativ. Die Möglichkeit, die IES-Bildung durch das Aldehyd-Rgs Dimedon zu blockieren (LIBBERT 1960), weist auf IAc in meinem Reaktionsprodukt aus Tryptophan hin.

Tryptophol (Indol-3-äthanol, TOH) ist als Intermediat der IES-Bildung aus Trypt wenig wahrscheinlich. IAc soll durch eine Aldehydoxydase umgesetzt werden (GORDON 1954) und nur unter anaeroben Bedingungen offensichtlich zu IES und TOH dismutieren (bei *Agrobacterium tumefaciens:* KAPER und VELDSTRA). Der R_f-Wert in IPOH und die Farbreaktionen des TOH (STOWE und THIMANN) sind denen von Xa (Tabelle 1) ähnlich; R_f von TOH unmittelbar unterhalb IA, R_f von Xa desgleichen. Allerdings liegen in IPOH alle neutralen Substanzen dicht beieinander; die R_f-Werte für TOH in HAc bzw. H_2O sind mir nicht bekannt; synthetisches TOH war nicht verfügbar. Gegen Identität von Xa und TOH spricht die Instabilität von Xa bei der Chromatographie; TOH würde nicht spontan zu IA und ICS umgesetzt werden.

Mit den folgenden sauren Indolderivaten kann die neutrale Substanz Xa nicht identisch sein. *Indol-3-milchsäure* hat in IPOH einen etwas höheren R_f-Wert als IES (STOWE und THIMANN); dort liegt in meinen Versuchen nur die Fluorescenz-Zone Fd. *Indol-3-acrylsäure* soll in IPOH/NH_3/H_2O (80/5/15) in unmittelbarer Nähe von Indol laufen (VLITOS und MEUDT) (?). Dort finde ich in der ätherischen Fraktion außer dem neutralen Xa nur die Fluorescenz-Zone Fa. Auch *Indol-3-propionsäure* tritt in meinen Versuchen nicht auf (vgl. die R_f-Werte synthetischer IPS in Tabelle 1 mit denen der gefundenen Zonen). *Indol-3-glycolsäure* und *Indol-3-glyoxylsäure* sind ebenfalls, nach den Angaben verschiedener Autoren (FISCHER; GREENBERG et al.; KAPER und VELDSTRA; BENTLEY et al. 1956; MELCHIOR) beurteilt, in meinen Versuchen nicht zu finden.

Hinweise auf Kuppelungsprodukte von IES oder Trypt mit anderen Substanzen gibt es in meinen Versuchen nicht. Das gilt für IES-Coenzym-A-Thioester (ZENK und LEOPOLD), Indol-3-acetyl-asparagin-säure (GOOD et al. 1956), Malonyl-

tryptophan (GOOD und ANDREAE), 5-Hydroxytryptophan (STOWE und THIMANN) und Ascorbigen (KUTACEK et al.).

Die Farbreaktionen und R_f-Werte des *IES-Äthylesters* (STOWE und THIMANN; SEN) und der Substanz Xa (Tabelle 1) sind ähnlich; in IPOH besitzt der Ester einen ähnlichen R_f-Wert wie Indol, in H_2O wie Trypt; beides gilt auch für Xa. Gegen Identität von Xa und IES-Äthylester spricht aber die Instabilität von Xa unter Zerfall zu ICS und die Unwahrscheinlichkeit einer IES-Veresterung in vitro ohne Zusatz von Alkohol.

Indol und *Skatol* können mit keiner meiner Substanzen der ätherischen Fraktion (in der sie vorkommen würden) identisch sein, denn sie sind in den Laufmitteln HAc und H_2O nicht nachweisbar (Tabelle 1).

Wie ist der *Hemmstoff-Einfluß* auf die Tryptophanumsetzung zu erklären? Durch HS blockiert wird die Entstehung von IES und Yb; angereichert werden Xa, TNH_2, Xb (?), ICS und IA; nicht beeinflußt Xc, Fa, Fb, Fc, Fd. Die IES-Oxydation wird nicht beeinflußt. — Von Xb möchte ich wegen der Unregelmäßigkeit, mangelnden Intensität und schlechten Definierbarkeit dieser Zone absehen. Die auf Nebenwegen liegenden ICS und IA werden unten besprochen. — Der *Farbstoff Yb* entsteht in geringerer Menge, wenn die IES-Bildung gehemmt ist; offensichtlich ist Yb ein Produkt des IES-Abbaus. Dafür spricht auch seine Anreicherung mit zunehmender Versuchsdauer.

Für die folgende Diskussion nehme ich 2 später zu veröffentlichende Ergebnisse vorweg: Bei Einwirkung des TE auf Xa entsteht IES; und aus TNH_2 entsteht unter TE-Einfluß Xa. — Wenn die Umsetzung eines Intermediats blockiert wird, reichert sich dieses an. Es werden aber wenigstens 2 Intermediate angereichert: TNH_2 und Xa. Es gibt 3 Erklärungsmöglichkeiten:

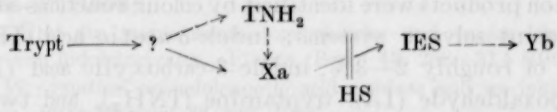
1. TNH_2 und Xa liegen in gerader Reaktionsfolge zwischen Trypt und IES; der HS blockiert die Umsetzung von Xa. Durch die Xa-Anreicherung verschiebt sich das Gleichgewicht der enzymatischen Reaktionen, die zur Xa-Bildung führen; es kommt zur Anreicherung der vor Xa liegenden Intermediate. Dieser Interpretation widersprechen allerdings die experimentell begründeten Ansichten, daß der Hauptweg der IES-Bildung nicht über TNH_2 führt (WILDMANN, FERRI und BONNER; GORDON 1956).

$$\text{Trypt} \longrightarrow TNH_2 \longrightarrow \text{Xa} \overset{\text{HS}}{\dashv\!\!\!\rightarrow} \text{IES} \longrightarrow \text{Yb}$$

Auch das unregelmäßige Auftreten von TNH_2 in meinen Versuchen deutet darauf, daß dieses auf einem Nebenweg liegt.

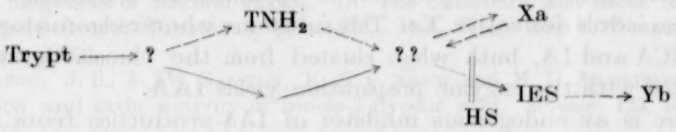
2. Durch Blockade des Hauptweges wird ein ebenfalls zur IES führender Nebenweg intensiviert. Die die beiden Wege einleitenden Enzyme

müßten ein gemeinsames Substrat („?“) angreifen, das begrenzt zur Verfügung steht, daher nicht Trypt sein kann. Die Schwierigkeit dieser



Interpretation liegt in der Annahme eines Intermediärproduktes zwischen Trypt und TNH_2. Der blockierte Hauptweg könnte über IBrS führen.

3. Die angereicherte Substanz Xa braucht nicht auf dem Wege zur IES zu liegen, obwohl sie durch TE zu IES umgesetzt werden kann. Durch Blockade der IES-Bildung kann ein anderer Weg intensiviert werden, der normalerweise nicht zur IES führt, aber reversibel ist.



Diese Interpretation wäre am wahrscheinlichsten, wenn Xa identisch mit Tryptophol sein sollte. Die obige Substanz „??“ wäre dann IAc, der normalerweise zu IES oxydiert wird und bei HS-Blockade der Oxydation dismutiert würde zu IES und Tryptophol. Bei anschließender HS-Entfernung könnte Tryptophol über IAc zu IES oxydiert werden.

Indol-3-aldehyd und *Indol-3-carboxylsäure* werden stets durch HS intensiviert. Ihre Entstehung aus IAN (Literatur: Ray; auch Fawcett et al.) scheidet in meinen Versuchen wegen Fehlens von IAN aus. — ICS und IA können bei enzymatischer Oxydation von IES entstehen (Literatur: Ray, auch Melchior 1958). Diese Entstehungsweise ist in meinen Versuchen höchstens untergeordnet: 1. besitzt das TE nur minimale IES-Oxydase-Aktivität (Libbert 1960); 2. führt verminderte IES-Ausbeute zu erhöhter ICS- und IA-Ausbeute.

Drei andere Bildungswege für IA und ICS sind in meinen Versuchen möglich: Beide Substanzen entstehen beim Spontanzerfall der IBrS (Kaper und Veldstra; Libbert unveröffentlicht), beim Spontanzerfall der Substanz Xa (diese Arbeit. Dadurch gelangt ICS in die neutrale Fraktion, s. S. 5) und bei TE-Einwirkung auf TNH_2 (unveröffentlicht). Beide letzteren Wege (vielleicht auch der erstere?) müssen bei HS-Einwirkung auf TE erhöhte IA- und ICS-Ausbeute ergeben. Sicher sind IA und ICS in meinen Versuchen heterogenen Ursprungs.

Summary

Buffered solutions of tryptophan were incubated with an impure enzyme preparation obtained from green pea plants. The enzymatical

reaction was interrupted after different times; the reaction products were separated by shaking with ether and paperchromatographed. The following reaction products were identified by colour reactions and R_f values in three different solvent systems: indole-3-acetic acid (IES = IAA), with a gain of roughly 2—3%, indole-3-carboxylic acid (ICS = ICA), indole-3-carboxaldehyde (IA), tryptamine (TNH_2), and two unknown indole derivatives; further two pigments partly originating from IAA-degradation and some fluorescing compounds originating enzymatically from tryptophan. Indole-3-pyruvic acid is unstable under the experimental conditions. The time course of the appearence of the different reaction products is reported.

ICA and IA when present in the reaction product are not products from IAA-oxidation but products of spontaneous degradation of the unknown indole derivative Xa. This substance when rechromatographed yields ICA and IA, buth when eluated from the chromatograms and incubated with the enzyme preparation yields IAA.

There is an endogenous inhibitor of IAA-production from tryptophan in pea plants which can be extracted with ether. This inhibitor when present during the enzymatical tryptophan-digestion lowers rigorously the IAA-gain but increases the gain of the unknown intermediate Xa (and consequently the gain of ICA and IA). It is concluded that the intermediary step of IAA-production from Xa to IAA is blocked by the inhibitor. TNH_2 concentration is also increased by the inhibitor. The relationship between Xa and TNH_2 increase is discussed.

Future work is concerned with the identification of the unknown intermediate Xa.

Frl. CHRISTIANE HERRMANN danke ich herzlich für sorgfältige technische Assistenz.

Literatur

ABRAMS, G. J. v.: Auxin relations in a dwarf pea. Plant Physiol. **28**, 443—456 (1953).

ANDREAE, W. A.: The natural auxins:Their nature, biosynthesis, and some aspects of their metabolism. Lecture, 9. Intern. Bot. Congr., Montreal, 14. 8. 1959.

BENTLEY, J. A.: The natural-occurring auxins and inhibitors. Ann. Rev. Plant Physiol. **9**, 47—80 (1958).

—, K. R. FARRAR, S. HOUSLEY, G. F. SMITH and W. C. TAYLOR: Some chemical and physiological properties of 3-indolylpyruvic acid. Biochem. J. **64**, 44—49 (1956).

CRADY, E., and F. WOLF: The production of indole acetic acid by *Taphrina deformans* and *Dibotryon morbosum*. Physiol. Plantarum (Cph.) **12**, 526—533 (1959).

DANNENBURG, W. D., and J. L. LIVERMAN: Conversion of tryptophan-2-C^{14} to indoleacetic acid by watermelon tissue slices. Plant Physiol. **32**, 263—269 (1957).

ELLIOTT, B. B., and A. C. LEOPOLD: An inhibitor of germination and of amylase activity in oat seeds. Physiol. Plantarum (Cph.) **6**, 65—77 (1953).

FAWCETT, C. H., H. F. TAYLOR, R. L. WAIN and F. WIGHTMAN: The metabolism of certain acids, amides and nitriles within plant tissues. Proc. roy. Soc. B **148**, 543—570 (1958).

FISCHER, A.: Über die papierchromatographische und papierelektrophoretische Trennung von Indolderivaten. Planta (Berl.) **43**, 288—314 (1954).

GALSTON, A. W.: Studies on indoleacetic acid oxidase and its inhibitor in light-grown peas. Plant Physiol. **32**, xxi (1957).

GOOD, N. E., and W. A. ANDREAE: Malonyltryptophan in higher plants. Plant Physiol. **32**, 561—566 (1957).

—, — and M. W. H. VAN YSSELSTEIN: Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. II. Some products of the metabolism of exogenous indoleacetic acid in plant tissues. Plant Physiol. **31**, 231—235 (1956).

GORDON, S. A.: Occurrence, formation, and inactivation of auxins. Ann. Rev. Plant Physiol. **5**, 341—378 (1954).

— The biogenesis of natural auxins. In: The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances. p. 65—75. R. L. WAIN and F. WIGHTMAN ed. London 1956.

GREENBERG, J. B., A. W. GALSTON, K. N. F. SHAW and M. D. ARMSTRONG: Formation and auxin activity of indole-3-glycolic acid. Science **125**, 992—993 (1957).

HENDERSON, J. H. M., and J. BONNER: Auxin metabolism in normal and crown gall tissue of sunflower. Amer. J. Bot. **39**, 444—451 (1952).

KAPER, J. M., and H. VELDSTRA: On the metabolism of tryptophan by Agrobacterium tumefaciens. Biochem. biophys. Acta **30**, 401—420 (1958).

KÖGL, F., u. J. ELEMA: Wirkungsbeziehungen zwischen Indol-3-essigsäure und Gibberellinsäure. Naturwissenschaften **47**, 90 (1960).

KÖVES, E.: Papierchromatische Untersuchungen der äther-löslichen Keimungs- und Wachstumshemmenden Stoffe der Haferspelze. Acta biol. Szeged, N. S. **3**, 179—187 (1957).

KONISHI, M.: Studies on development of flowering stalks in long-day plants in relation to auxin metabolism. Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ. No **75**, 1—70 (1956).

KUTÁCEK, M., M. VALENTA u. F. I. ICHA: Untersuchungen über den Ascorbigengehalt von Kohlrabi *(Brassica oleracea* v. *gongylodes)* während der Vegetation und den Zusammenhang zwischen Ascorbigen und Wachstum bei den Pflanzen der Familie *Brassicacae*. Experientia (Basel) **13**, 284—286 (1957).

LARSEN, P.: Formation, occurrence, and inactivation of growth substances. Ann. Rev. Plant Physiol. **2**, 169—198 (1951).

— On the separation of acidic and non-acidic auxins. Physiol. Plantarum (Cph.) **8**, 343—357 (1955).

LIBBERT, E.: Das Zusammenwirken von Wuchs- und Hemmstoffen bei der korrelativen Knospenhemmung. II. Mitt. Planta (Berl.) **45**, 68—81 (1955).

— Untersuchungen über die Physiologie der Adventivwurzelbildung. III. Untersuchung der Hemmstoffe, mittels derer eine Wurzel die Adventivwurzelbildung beeinflußt. Z. Bot. **45**, 57—76 (1957).

— Die Regulation des Wurzelwachstums durch synthetische und endogene Inhibitoren. Planta (Berl.) **50**, 25—40 (1957).

— Der primäre Angriffsort pflanzeneigener Hemmstoffe. Physiol. Plantarum (Cph.) **11**, 516—513 (1958).

— Some special aspects of the function of endogenous growth inhibitors in dormancy. Lecture, 9. Intern. Bot. Congr., Montreal, 26. 8. 1959.

LIBBERT, E.: Das Indolessigsäure-bildende Enzymsystem aus Erbsenpflanzen. Z. Bot. **48**, 365—380 (1960).

—, u. G. BALLIN: Vorkommen, Wirksamkeit und fermentative Umsetzung des Indol-3-acetonitrils in verschiedenen Pflanzen. Naturwissenschaften **46**, 532 bis 533 (1959).

LINSER, H., u. O. KIERMAYER: Fluorescenzanalytischer Nachweis von Indolkörpern insbesondere Indol-acetonitril auf Papierchromatogrammen. Biochim. biophys. Acta **21**, 382 (1956).

LIVERMAN, J. L., and W. N. DANNENBURG: Conversion of tryptophan and indoleacetonitrile to indoleacetic acid by *Avena coleoptile tissue*. Plant Physiol. **32**, xviii (1957).

LUND, H. A.: The biosynthesis of indoleacetic acid in the styles and ovaries of tobacco preliminary to the setting of fruit. Plant Physiol. **31**, 334—339 (1956).

MANNING, D. Z., and A. W. GALSTON: On the nature of the enzymatically catalized oxydation products of indoleacetic acid. Plant Physiol. **30**, 225—231 (1955).

MATTHIAS, W.: Über ein papierchromatographisches Verfahren für Serienuntersuchungen in der Pflanzenzüchtung. Züchter **24**, 313—316 (1954).

MELCHIOR, G. H.: Über den Abbau von Indolderivaten. I. Mitt. Photolyse durch ultraviolettes Licht. Planta (Berl.) **50**, 262—290 (1957).

— Über den Abbau von Indolderivaten. II. Mitt. Abbau durch ein Enzymsystem aus Weißkohl und ein Vergleich der Indolderivate in UV-behandelten und unbehandelten Weißkohlpflanzen. Planta (Berl.) **50**, 557—575 (1958).

PROCHÁZKA, Z.: Indolderivate. In I. M. HAIS u. K. MACEK: Handbuch der Papierchromatographie, S. 585—592. Jena 1958a.

— Indole derivates in plants containing ascorbigen. Detection of indole-3-carboxylic acid in cauliflower and in cabbage. Chem. Listy **52**, 1364—1366 (1958b).

RAY P. M.: Destruction of auxin. Ann. Rev. Plant Physiol. **9**, 81—118 (1958).

SEN, S. P.: Wachstumsregulatoren und verwandte Stoffe. In H. F. LINSKENS, Papierchromatographie in der Botanik, S. 248—281. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.

SIEGEL, S. M.: Growth- and enzyme-inhibiting properties of bean seed extracts. Plant Physiol. **32**, 151—152 (1957).

STOWE, B. B., and K. V. THIMANN: The paper chromatography of indole compounds and some indole-containing auxins of plant tissues. Arch. Biochem. **51**, 499—516 (1954).

TONZIG, S., e F. TREZZI: Ricerche sulla fisiologia dell'acido ascorbico. XI. Meccanismo competitivs dell'interazione acido ascorbico — acido indolacetico. Atti Accad. naz. Lincei, Ser. VIII, **17**, 324—331 (1955).

VLITOS, A. J., and W. MEUDT: The role of auxin in plant flowering. I. A quantitative method based on paper chromatography for the determination of indole compounds and of 3-indoleacetic acid in plants. Contr. Boyce Thompson Inst. **17**, 197—202 (1953).

WEISSBACH, H., W. KING, A. SJOERDSMA and S. UDENFRIED: Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals. J. biol. Chem. **234**, 81—86 (1959).

WILDMAN, S. G., M. G. FERRI and J. BONNER: The enzymatic conversion of tryptophan to auxin by spinach leaves. Arch. Biochem. **13**, 131—144 (1947).

ZENK, M. H., and A. C. LEOPOLD: Synthesis of indolylacetyl coenzyme A. Plant Physiol. **32**, xxi (1957).

Prof. Dr. E. LIBBERT,
Botanisches Institut, Universität, Rostock, Doberaner Straße 143

Planta 56, 23—27 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Rostock

BLOCKADE DES GIBBERELLINSÄURE-TRANSPORTS IN HYPOCOTYLSEGMENTEN DURCH TRIJODBENZOESÄURE. ZUGLEICH EIN NEUER AGARBLOCKTEST AUF GIBBERELLINE*

Von

TERESA KENTZER und EIKE LIBBERT

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 5. September 1960)

Schon in den frühesten Arbeiten über die blühfördernde und andere Wirkungen der Trijodbenzoesäure (TIBA) wurden Veränderungen im Auxinstoffwechsel als Ursachen der TIBA-Effekte diskutiert (ZIMMERMAN und HITCHCOCK). Für die Erklärung der Beziehungen zwischen TIBA und Auxin gibt es verschiedene Hypothesen (Zusammenstellung: LIBBERT 1959). Zumindest eine dieser Beziehungen konnte von mehreren Autoren sichergestellt werden: Die Blockade der Auxinleitung in der Pflanze durch TIBA (KUSE 1953, HAY 1956 u. a.). Während die Mehrzahl der Autoren den TIBA-Effekt als spezifisch auf den Auxintransport gerichtet ansieht, hält LIBBERT die TIBA für eine Substanz, die eine allgemeine Hemmung energiebedürftiger Transportvorgänge in der Pflanze verursacht. Nachgewiesen wurde das allerdings nur für pflanzenfremde, synthetische Regulatoren und eine native, aber chemisch unbekannte Substanz. Es ist interessant zu erfahren, wie sich der Gibberellinsäure-Transport (ein nach KATO im Gegensatz zum Auxintransport apolarer Mechanismus) unter der Wirkung von TIBA verhält.

Zwischen Gibberellinsäure (GA) und Auxin besteht eine Wechselwirkung in Art eines Synergismus. Das wurde von vielen Autoren gefunden; wir beschränken uns auf die Feststellung von BRIAN und HEMMING und von KUSE (1958), daß für die Wirksamkeit von GA in der Pflanze das Vorhandensein von Auxin Vorbedingung ist.

KUSE (1958) zeigte, daß gewisse GA-Wirkungen durch TIBA-haltige Pastenringe aufgehoben werden können. Er erklärt das mit der nachgewiesenen Blockade des Auxin-Transports durch TIBA; in den vom Auxinnachschub abgeschnittenen Pflanzenteilen könne GA nicht mehr wirken. Ob TIBA daneben auch den GA-Transport selbst beeinflußt, wird von KUSE nicht erwogen.

Zur Untersuchung des GA-Transportes bedienten wir uns der klassischen Methode, die zu untersuchende Substanz (GA) in einem Agarblöckchen inkubiert der einen Schnittfläche eines zweiseitig isolierten Achsenorganes zuzuführen und die hindurchgeleitete Menge in einem zweiten Agarblöckchen aufzufangen und biologisch zu testen. Um eine

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. HERMANN VON GUTTENBERG zum 80. Geburtstag.

Eluation der transportierten Substanz aus dem Acceptorblöckchen unnötig zu machen, ist die Anwendung einer GA-Testmethode nötig, bei der GA in Agarblöckchen inkubiert appliziert wird, im Gegensatz zu den bekannten Testmethoden, bei denen GA-Lösung in flüssiger Form injiziert, aufgetropft oder aufgesprüht wird. Eine derartige Testmethode beschreiben wir untenstehend.

Methode

GA-Test. Material: Im Gewächshaus angezogene, 14 Tage alte Pflanzen der Zwergerbsensorte „De Grace". Die Pflanzen hatten in diesem Alter 3 vollentwickelte Blätter. An der Basis des 3. Blattes wurde oberseits die Epidermis mit einer Rasierklinge entfernt und das Test-Agarblöckchen aufgesetzt. Dieses befand sich somit unmittelbar unterhalb der Gipfelknospe. Die Agarblöckchen waren $2 \times 2 \times 0{,}5$ mm groß und enthielten 1,5% Agar-Agar. Um eine Austrocknung der Blöckchen zu verhindern, wurden alle Pflanzen mit Bechergläsern zugedeckt und außerdem täglich die Blöckchen mit einem Tropfen Wasser angefeuchtet. 2, 4 und 6 Tage nach der Applikation der Blöckchen wurde der Zuwachs gemessen; und zwar von der Basis des 3. Blattes (dem Applikationsort) in der ersten Versuchsreihe bis zur Spitze der Pflanze, in der zweiten Versuchsreihe bis zum nächsthöheren Knoten.

Transportversuche. Material: Im Gewächshaus gezogene, 8 Tage alte Keimlinge von *Helianthus annuus* („Bernburger Futtersonnenblume"). Die Wurzel wurde abgetrennt und die oberirdischen Teile für 8 Std zu je 20 Stück in 10 ml einer TIBA-Lösung (100 ppm) gestellt. Kontrollobjekte standen währenddessen in destilliertem Wasser. Dann wurde 5 mm unterhalb der Kotyledonen je ein 5 mm langer Zylinder aus jedem Hypocotyl geschnitten und mit seiner basalen Schnittfläche auf ein Acceptorblöckchen aus reinem Agar (Größe s. oben) gestellt. Auf die obere Schnittfläche wurden die Donatorblöckchen gesetzt, die 200 ppm GA enthielten. Während der Transportzeit von 3 Std standen die Objekte in einer feuchten Kammer (auf Objektträgern in mit feuchtem Filtrierpapier ausgekleideten Petrischalen). Anschließend wurden die abgenommenen Acceptorblöckchen 6 Std in einer feuchten Kammer belassen. Das verwendete GA-Präparat war reine Gibberellinsäure (Gibberellin A_3).

Ergebnisse und Diskussion

Es wurden 2 Versuchsreihen angesetzt, von denen jede 4 Varianten mit je 10 Pflanzen umfaßte. Die Varianten waren folgende: a) Agarblöckchen mit 200 ppm GA den Testpflanzen (Zwergerbsen) aufgesetzt; b) Acceptorblöckchen nach Transportversuchen durch unbehandelte Zylinder den Testpflanzen aufgesetzt; c) Acceptorblöckchen nach Transportversuchen durch TIBA-behandelte Zylinder den Testpflanzen aufgesetzt; d) reine Agarblöckchen den Testpflanzen aufgesetzt.

Die Ergebnisse der 1. Versuchsreihe sind in Tabelle 1 und Abb. 1 dargestellt. Die Signifikanzangaben basieren auf dem *t*-Test. Die Zuwachs-

unterschiede zwischen GA-behandelten und unbehandelten Kontrollpflanzen sind bereits nach 2 Tagen sehr deutlich und hochsignifikant. Das beweist die Eignung der Testmethode als Test für GA. Die Acceptorblöckchen, die die durch unbehandelte Hypocotylzylinder geleitete GA auffingen, enthalten verständlicherweise weniger GA als die Kontroll-GA-Blöckchen. Wichtig ist aber, daß in denjenigen Acceptorblöckchen, die zum Auffangen der durch TIBA-behandelte Zylinder transportierten GA dienten, *noch* weniger GA nachweisbar ist und daß der Unterschied im Leitvermögen zwischen unbehandelten und TIBA-

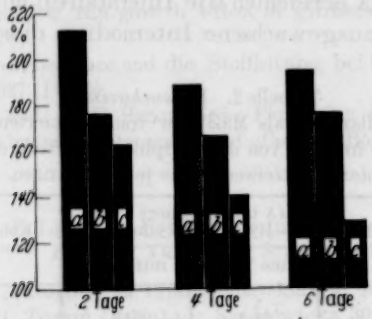


Abb. 1. Versuchsreihe 1. Zuwachs der Testpflanzen als Maß der transportierten GA-Menge. Ordinate: Länge der Testpflanzen in % der mit reinem Agar behandelten Kontrollpflanzen, gemessen von der Applikationsstelle des Testblöckchens bis zur Spitze. Mittelwerte aus je 10 Pflanzen. *a* Kontrollen mit 200 ppm GA; *b* GA transportiert durch unbehandelte Hypocotylzylinder; *c* GA transportiert durch TIBA-behandelte Hypocotylzylinder

behandelten Zylindern hochsignifikant ist (Tabelle 1). — Die Differenz zwischen den Zuwachsraten nach GA-Transport durch unbehandelte und denen nach Transport durch TIBA-behandelte Zylinder wird mit

Tabelle 1. *Versuchsreihe 1*

Zuwachs der Testpflanzen als Maß der transportierten GA-Menge. Zahlen: Länge der Testpflanzen in mm von der Applikationsstelle des Testblöckchens bis zur Spitze, Mittelwerte aus je 10 Pflanzen.

Zeitdauer in Tagen	Kontrolle: 200 ppm GA	GA transportiert durch Hypocotylzylinder		Kontrolle: reiner Agar	Signifikante Differenz ($P = 0{,}001$)
		ohne TIBA	mit TIBA		
2	63,6	52,3	48,1	29,8	6,8
4	78,1	68,8	58,0	41,4	6,0
6	94,3	85,3	62,5	48,2	5,9

zunehmender Dauer des GA-Tests größer, ein Zeichen dafür, daß im letzteren Falle die transportierte GA-Menge so gering ist, daß ihr Effekt auf die Testobjekte sich bald erschöpft (Abb. 1).

Schlüsse auf die transportierte GA-Menge und damit auf die Transportgeschwindigkeit können aus den vorliegenden Experimenten nicht gezogen werden,

da wir keine Konzentrations/Wirkungskurve für GA mit dem beschriebenen Test aufgestellt haben.

Die 2. Versuchsserie (Tabelle 2) unterscheidet sich von der ersten nicht nur durch die andere Art der Auswertung (an den Testpflanzen nur die Länge des Internodiums oberhalb der Applikationsstelle gemessen statt ganze Sproßlänge über der Applikationsstelle), sondern auch durch die Verwendung einheitlicheren Testmaterials: Zum Test wurden nur solche Pflanzen verwendet, bei denen das zu messende Internodium vor der GA-Applikation 9—10 mm lang war. Bei den Kontrollpflanzen ohne GA erreichten die Internodien mit 22 mm ihre maximale Länge, die für ausgewachsene Internodien dieser Zwergerbsensorte

Tabelle 2. *Versuchsreihe 2*

Zuwachs der Testpflanzen als Maß der transportierten GA-Menge. Zahlen: Länge der Testpflanzen in mm von der Applikationsstelle des Testblöckchens bis zum nächsthöheren Knoten, Mittelwerte aus je 10 Pflanzen.

Zeitdauer in Tagen	Kontrolle: 200 ppm GA	GA transportiert durch Hypocotylzylinder		Kontrolle: reiner Agar	Signifikante Differenz ($P = 0{,}001$)
		ohne TIBA	mit TIBA		
2	23,3	24,4	20,6	17,3	4,4
4	42,8	38,8	28,7	21,3	5,3
6	52,5	44,9	32,7	22,1	4,5

typisch ist. Die Internodien GA-behandelter Pflanzen werden weit länger. — Im übrigen bestätigt die 2. Versuchsserie in jeder Weise die Ergebnisse der ersten.

Ebenso wie LIBBERT für das Verhältnis zwischen IES und TIBA ausgeführt hat, halten wir auch die Beziehungen zwischen GA und TIBA für kausal vielseitig; mit anderen Worten: TIBA dürfte mehrere Effekte auf den GA-Haushalt haben. Zum Beispiel werden dem von KIERMAYER beschriebenen Synergismus zwischen den beiden Substanzen andere Ursachen unterliegen als eine Transportblockade.

Der in unseren Versuchen geführte Beweis einer Hemmung des GA-Transports durch TIBA bestätigt die Ansicht, daß TIBA eine allgemeine Blockade energiebedürftiger Transportvorgänge in der Pflanze verursacht.

Summary

Gibberellic acid (GA) was incubated in agar blocks, transported through hypocotyl sections of sunflower plants, and collected in acceptor blocks of plain agar. The amount of GA transported through the sections was tested with dwarf pea plants using a new test method in which the acceptor block was applied directly to the test plant. The GA transport was significantly lower through hypocotyl section from plants which had been treated with triiodobenzoic acid (TIBA) before isolation of the sections. TIBA inhibits the transport of GA.

Literatur

BRIAN, P. W., and H. G. HEMMING: Complementary action of gibberellic acid and auxins in pea internode extension. Ann. Bot. **22**, 1—17 (1958).

HAY, J. R.: The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,3,5-triiodobenzoic acid on the transport of indoleacetic acid. Plant Physiol. **31**, 118—120 (1956).

KATO, J.: Nonpolar transport of gibberellin through pea stem and a method for its determination. Science **128**, 1008—1009 (1958).

KIERMAYER, O.: Die formative Wirksamkeit der 2,3,5-Trijodbenzoesäure (TIBA) in Gegenwart von Gibberellinsäure (GA). Planta (Berl.) **55**, 153—168 (1960).

KUSE, G.: Effect of 2,3,5-triiodobenzoic acid on the growth of lateral buds and on tropism of petiole. Mem. Coll. Sci. Kyoto, Ser. B **20**, 207—215 (1953).

— Necessity of auxin for the growth effect of gibberellin. Bot. Mag. (Tokyo) **71**, 151—159 (1958).

LIBBERT, E.: Trijodbenzoesäure und die Stoffleitung bei höheren Pflanzen. Planta (Berl.) **53**, 612—627 (1959).

ZIMMERMAN, P. W., and A. E. HITCHCOCK: Flowering habit and correlation of organs modified by triiodobenzoic acid. Contr. Boyce Thompson Inst. **12**, 492—496 (1942).

Prof. Dr. E. LIBBERT, Botanisches Institut der Universität, Rostock, Doberaner Straße 143

Dr. T. KENTZER, Abteilung für Pflanzenphysiologie, Kopernikus-Universität, Toruń (Polen) ul. Sienkiewicza 30/32

Planta 56, 28—70 (1961)

ENDOGENER RHYTHMUS UND CO_2-STOFFWECHSEL BEI PFLANZEN MIT DIURNALEM SÄURERHYTHMUS* **

Von

E. L. NUERNBERGK

Mit 20 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. September 1960)

I. Einleitung

Die nachfolgend beschriebenen Versuche und die sie ergänzende Diskussion schließen an drei bzw. vier verschiedene Arbeiten an (NUERNBERGK 1954, 1955a, b, 1957), die sich vor allem mit dem CO_2-Stoffwechsel von Pflanzen mit succulenten Assimilationsorganen beschäftigen. Als Hauptmeßinstrument wurde bei den Untersuchungen der Ultrarot-Absorptionsschreiber (URAS) benutzt.

Die ganze Versuchseinrichtung wurde seit meiner ersten Veröffentlichung (1954) ständig verbessert (vgl. FEINDT 1960), ohne daß sich prinzipiell an den im Laufe von 6—7 Jahren erhaltenen experimentellen Ergebnissen Wesentliches geändert hat. Ich glaube daher, daß der von mir beobachtete eigenartige CO_2-Stoffwechsel und endogene Rhythmus auf keinerlei „Zufallstreffer" beruhen.

Obwohl m. E. meine Befunde bei der theoretischen Interpretation des diurnalen Säurestoffwechsels der Succulenten berücksichtigt werden müßten, haben andere Autoren von ihnen nur vereinzelt Notiz genommen. Auch RANSON-THOMAS (1960) gehen in ihrer Übersicht über den Crassulaceen-Säurestoffwechsel (CAM) nicht auf sie ein. Ich will daher, bevor ich meine neuen Untersuchungen beschreibe, nochmals kurz den Hergang des CO_2-Stoffwechsels bei Succulenten schildern, wie er sich aus meinen bisherigen Versuchsergebnissen konstruieren läßt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß sich meine Experimente immer auf den gesamten CO_2-Stoffwechsel *intakter* Pflanzen im Verlaufe einer längeren Periode von mindestens 24 h erstrecken, nicht etwa auf kurzfristige Erscheinungen, die im einzelnen innerhalb des größeren Rahmens beobachtet werden können. Ich denke hier z. B. an solche Versuche,

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. v. GUTTENBERG zum 80. Geburtstag gewidmet.

** Folgende Abkürzungen wurden verwandt: ADP = Adenosin-Diphosphat; ATP = Adenosin-Triphosphat; CAM = Crassulaceen-Säurestoffwechsel (Crassulacean acid metabolism); DPN = Diphosphorpyridinnucleotid; $DPNH_2$ = reduziertes Diphosphorpyridinnucleotid; Pi = anorganisches Phosphat (inorganic phosphate); PEP = Phosphoenolbrenztraubensäure (Phosphoenolpyruvat); PGA = Phosphoglycerinsäure (Phosphoglyceric acid); RDP = Ribulosediphosphat; TPN = Triphosphopyridinnucleotid; $TPNH_2$ = reduziertes Triphosphopyridinnucleotid.

wo nach einer kurzen Bestrahlung die zuerst in einzelnen Blättern auftretenden Stoffwechselprodukte analysiert worden sind.

Alle Versuchspflanzen wurden in Bimskies kultiviert und 2—3mal wöchentlich mit Nährlösung begossen. Diese hatte folgende Zusammensetzung: Auf 1000 ml Wasser kommen 10 mg $NaNO_3$, 200 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 350 mg $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$, 330 mg KH_2PO_4, 100 mg $CO(NH_2)_2$, 15 mg Ferricitrat und 1 ml Hoaglandsche A-Z-Spurenelementlösung. Die Konzentration beträgt etwa 1‰. Angesäuert auf p_H 5,5 wird mit Phosphor- oder Salpetersäure.

Als Lichtquelle diente, wenn nichts anderes angegeben ist, die Hochdruck-Hg-Lampe mit Leuchtstoff, Type HPL 400 W von Philips.

Bei vielen Pflanzen mit diurnalem Säurerhythmus gibt es einen parallel verlaufenden 24stündigen Rhythmus des Kohlendioxyd-Stoffwechsels (NUERNBERGK 1954, 1955a, b, 1957). Der Rhythmus besteht in einer *starken* CO_2-Aufnahme während der Dunkelperiode und einer *schwachen* Kohlendioxydabgabe oder -aufnahme während der Lichtperiode (S. 55ff.). Das in der Dunkelperiode aufgenommene CO_2 wird in Form von l-Äpfelsäure gespeichert, wodurch die starke Aciditätszunahme des Zellsaftes während dieser Periode zustande kommt. In der Lichtperiode wird die Äpfelsäure wieder abgebaut, während gleichzeitig die Acidität abnimmt. In extremen Fällen wird praktisch alle, für die Assimilation notwendige CO_2 in der vorhergehenden Dunkelperiode gespeichert, und die Pflanze nimmt während der Lichtperiode überhaupt kein CO_2 auf oder gibt dann sogar geringe Mengen CO_2 — vielleicht infolge ihrer Atmung — ab.

Möglicherweise kommt die Kohlendioxyd-Speicherung durch Wasserstoffübertragung mittels reduzierter Pyridinnucleotide ($TPNH_2$ oder $DPNH_2$) zustande (S. 64ff.). In der Lichtperiode werden die während der Dunkelperiode oxydierten Coenzyme wieder durch Aufnahme von Lichtenergie reduziert.

II. Die Voraussetzungen für das Auftreten der nächtlichen CO_2-Fixierung

Damit die nächtliche Kohlendioxydbindung zustande kommt, müssen mindestens 3 Bedingungen erfüllt sein:

1. das Vorhandensein des enzymatischen Reaktionssystems;

2. eine genügende Succulenz der assimilierenden Gewebe, d. h. eine ausreichende Speicherungsmöglichkeit für die Äpfelsäure;

3. eine unterschiedliche Permeabilität (Intra- und Extrabilität)[1] der Chlorophyll enthaltenden Zellen für CO_2 bei Licht und in Dunkelheit.

Zu 1. Man kann annehmen, daß das enzymatische Reaktionssystem als Voraussetzung für das Auftreten des De Saussure-Effektes (nächt-

[1] Der Begriff „Permeabilität" wird von mir hier provisorisch gebraucht. Hierüber bzw. über die Art der Diffusion von CO_2 in die Zellen von Landpflanzen ist bisher nur äußerst wenig bekannt (vgl. RABINOWITSCH 1951, 1956 und VAN DEN HONERT 1930, S. 227).

liche CO_2-Speicherung) immer vorhanden ist (vgl. RANSON-THOMAS l. c., S. 97). Dieses erhellt daraus, daß nur chlorophyllhaltige Organe zur Speicherung befähigt sind, und *daß die Voraussetzung für ihr Eintreten eine ausreichende vorherige Beleuchtung ist.* Merkwürdigerweise ist dieser Kardinalpunkt von allen neueren Forschern auf unserem Gebiet übersehen oder nicht genügend berücksichtigt worden, obwohl doch schon DE VRIES (1884) die Abhängigkeit des Grades der nächtlichen Ansäuerung von der *Lichtmenge* während des vorangegangenen Tages beobachtet hatte (vgl. NUERNBERGK 1957, S. 209).

Da nun der Chlorophyllapparat nach den bisherigen Feststellungen stets Wasserstoff übertragende Enzymsysteme enthält, und für ihre Wirkung beim CAM nur notwendig ist, daß sie mit Hilfe der vom Chlorophyll aufgenommenen Lichtenergie reduziert werden, ist es nicht notwendig, daß die Succulenten mit CAM noch spezifische Enzyme enthalten, die bei Pflanzen mit „normaler" Photosynthese nicht vorhanden sind.

Zu 2. Dieses ergibt sich auch aus der Analyse der 2. Bedingung. RANSON-THOMAS (1960, S. 85, 97, 98)[1] machen in ihrer Übersicht mit Recht darauf aufmerksam, daß die Entstehung des Malats und seine Speicherung in der Zelle an getrennten Orten stattfindet. Die Malatbildung erfolgt, wie schon oben erwähnt, nur in grünen Organen und ist daher an das Vorhandensein von Chlorophyll gebunden. Dieses findet sich nur im Cytoplasma, und daher kann auch nur das Cytoplasma der Syntheseort für die Äpfelsäure sein. Andererseits können die bedeutenden Mengen Malat, die vor allem während der Nacht bzw. der ersten Stunden der Nyctoperiode gebildet werden, nicht im Cytoplasma verbleiben, sondern werden in der Vacuole gespeichert.

Aus diesen Tatsachen ist es verständlich, daß nur succulente Blätter mit großen Vacuolen in den Zellen in der Lage sind, eine CO_2-Speicherung auszuführen.

Ein schönes Beispiel ist hierfür *Kalanchoe blossfeldiana* (NUERNBERGK 1955a, b, S. 69 und 1957, S. 288). Meine URAS-Versuche zeigten bei dieser Art, daß nur die succulenten, im Kurztag gebildeten Blätter den De Saussure-Effekt aufweisen, nicht aber die dünnen, im Langtag erzeugten Blätter. Analoge Verhältnisse findet man ferner bei vielen *Orchidaceae*, *Euphorbiaceae* und *Asclepiadaceae*. Auch hier sind die untersuchten Species mit succulenten Assimilationsorganen zur Speicherung befähigt, bei den *Orchidaceae* z. B. *Cattleya*, *Encyclia atropurpurea*, *Epidendrum ellipticum*, *E. schomburgkii*, *Schomburgkia*, nicht aber dünnblättrige Arten, wie *Coelogyne cristata*, *Cymbidium*, *Paphiopedilum* und *Thunia*. In gleicher Weise gibt es bei der Ascle-

[1] Die von RANSON-THOMAS (l. c.) berücksichtigten Arbeiten werden weiterhin nur besonders zitiert, soweit dieses erforderlich ist.

piadacee *Hoya carnosa* mit dicken Blättern eine Speicherung, bei *Hoya bella* mit dünnen Blättern aber keine, bei der cereusartigen *Euphorbia*

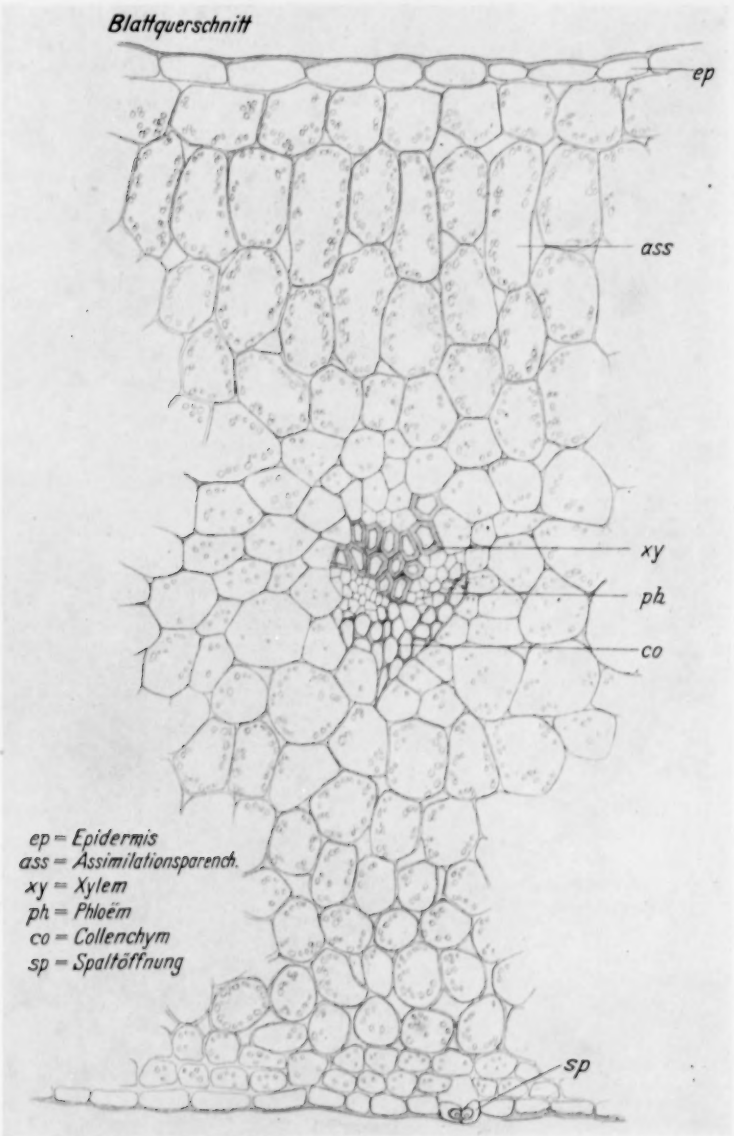


Abb. 1. *Bryophyllum daigremontianum*, Blattquerschnitt (mit De Saussure-Effekt)

grandidens CO_2-Speicherung, nicht aber bei den mit größeren, dünnen Laubblättern versehenen *Euphorbia pulcherrima* (vgl. NUERNBERGK

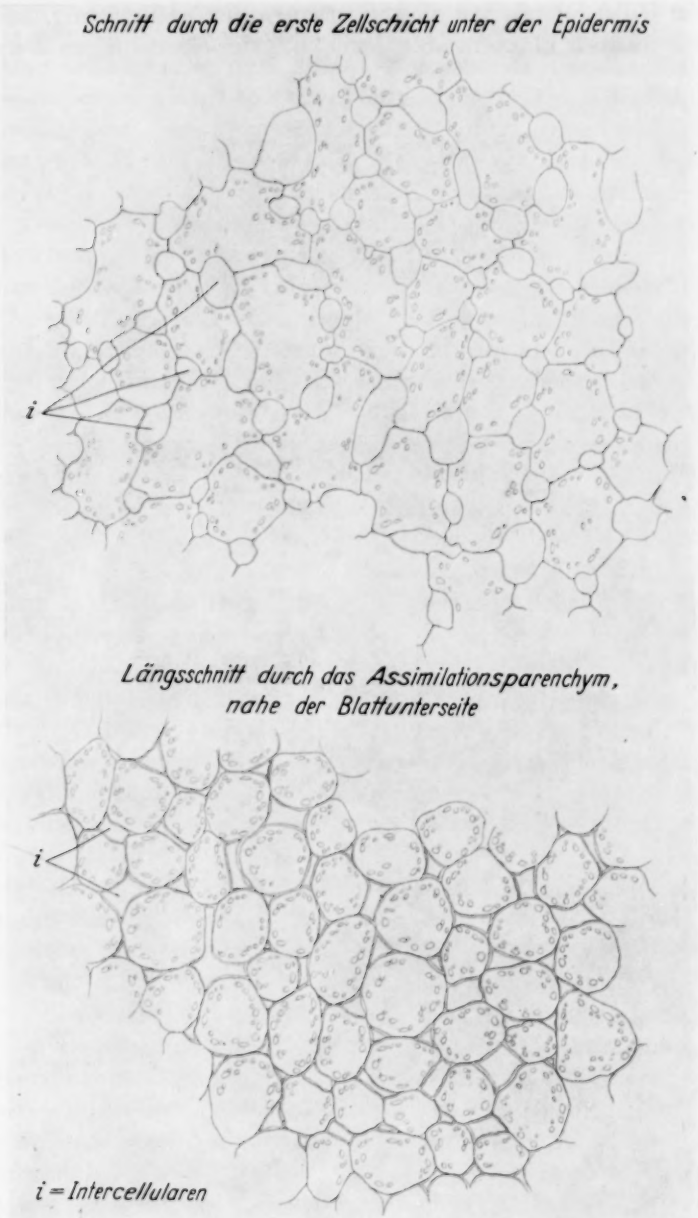


Abb. 2a u. b. *Bryophyllum daigremontianum.* a Schnitt durch die erste Zellschicht unter der Epidermis; b Längsschnitt durch das Assimilationsparenchym, nahe der Blattunterseite

1957, Abb. 11) und *E. splendens.* Schließlich sind hier auch noch die succulenten *Cactaceae*, z. B. *Zygocactus* mit Speicherung und als Gegen-

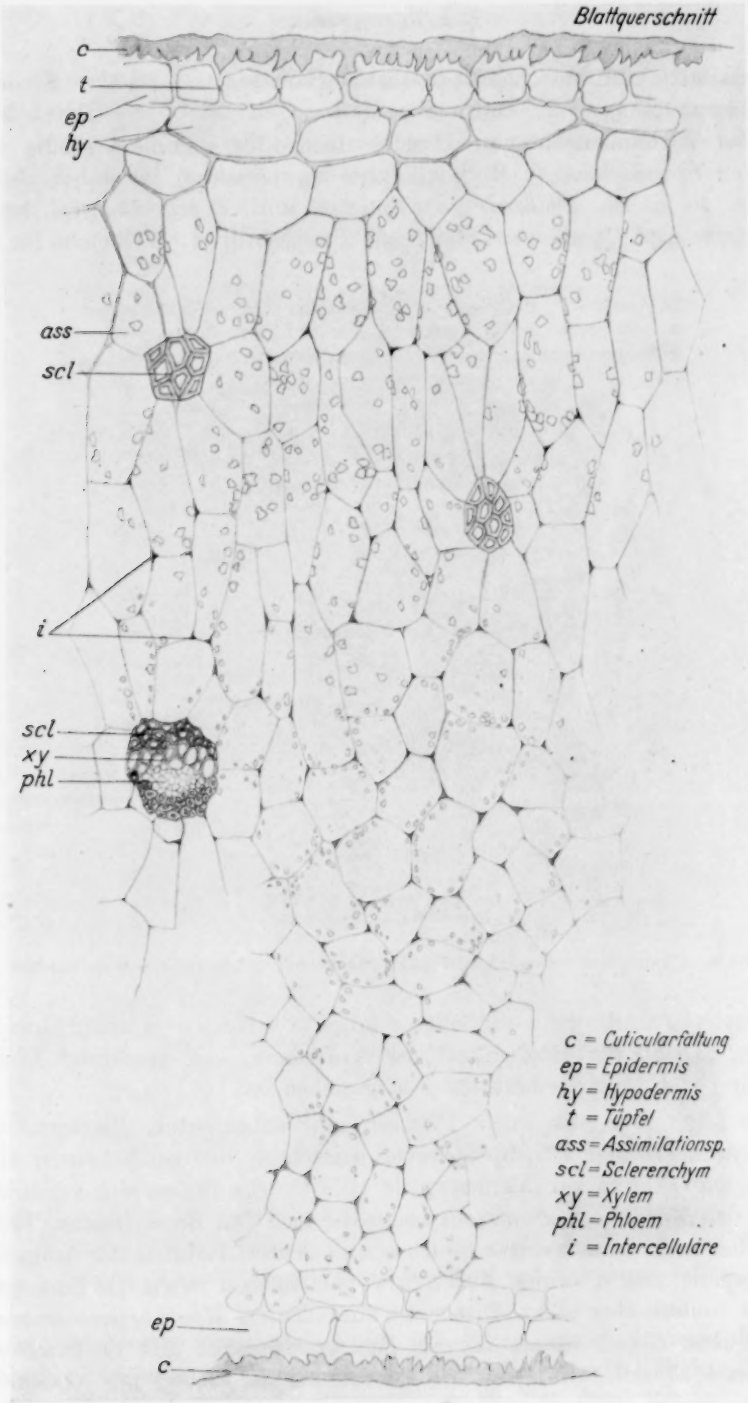


Abb. 3. *Epidendrum ciliare*, Blattquerschnitt (mit De Saussure-Effekt)

satz dazu die nicht succulente Cactusart *Peireskia aculeata* ohne Speicherung zu nennen.

Das Vorhandensein von Pseudobulben oder allgemein mäßig verdickten Sproßachsen (z. B. bei *Euphorbia splendens*) ist dabei gleichgültig, so haben *Epidendrum ellipticum* und *E. schomburgkii* keine, *Coelogyne* und *Cymbidium* aber wohl Pseudobulben. Vielleicht ist der

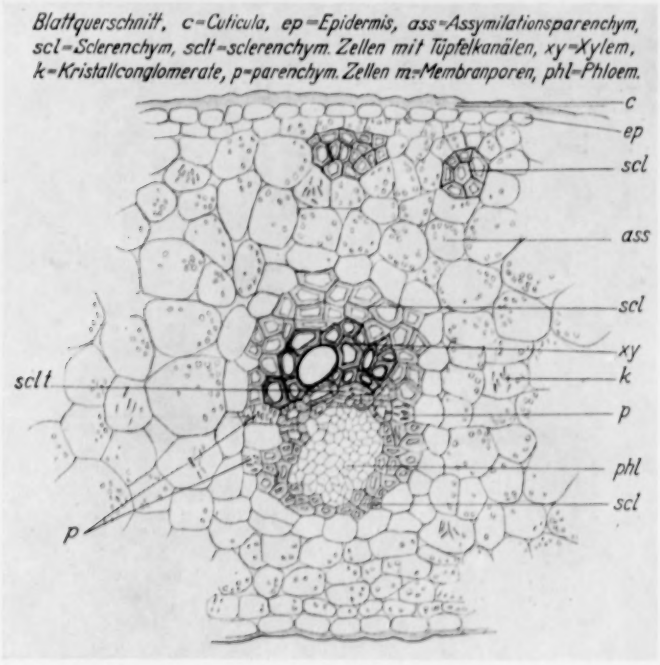


Abb. 4. *Cymbidium pauwelsii hort.* Blattquerschnitt (ohne De Saussure-Effekt)

Chlorophyllgehalt der mehr oder weniger verdickten Sproßorgane zu gering, so daß die Möglichkeit der Aufnahme von genügend Lichtenergie zur Enzym-Reduktion nicht gegeben ist.

Es gibt aber nun auch Pflanzen mit succulenten Blättern, die keinerlei nächtliche CO_2-Speicherung ausführen und auch keinen ausgeprägten CAM haben (NUERNBERGK 1955a). Sie finden sich vor allem unter den *Mesembryanthemaceae* und wohl auch den *Bromeliaceae*. Trotz äußerlich mehr oder weniger gleichen succulenten Habitus der Assimilationsorgane zeigen einige Arten bzw. Gattungen einen De Saussure-Effekt, andere aber nicht. Unter den succulenten *Mesembryanthemaceae* findet man diesen Gegensatz bei *Faucaria hybrida* mit Speicherung, *Gibbaeum shandii*, *Glottiphyllum* (NUERNBERGK 1955a) und *Oscularia* (NUERNBERGK 1957) ohne Speicherung. *Bergeranthus multiceps* nimmt

mit einem sehr schwachen De Saussure-Effekt eine Mittelstellung ein. Bei den *Bromeliaceae* haben *Billbergia nutans*, *Neoregelia ampullaceae*

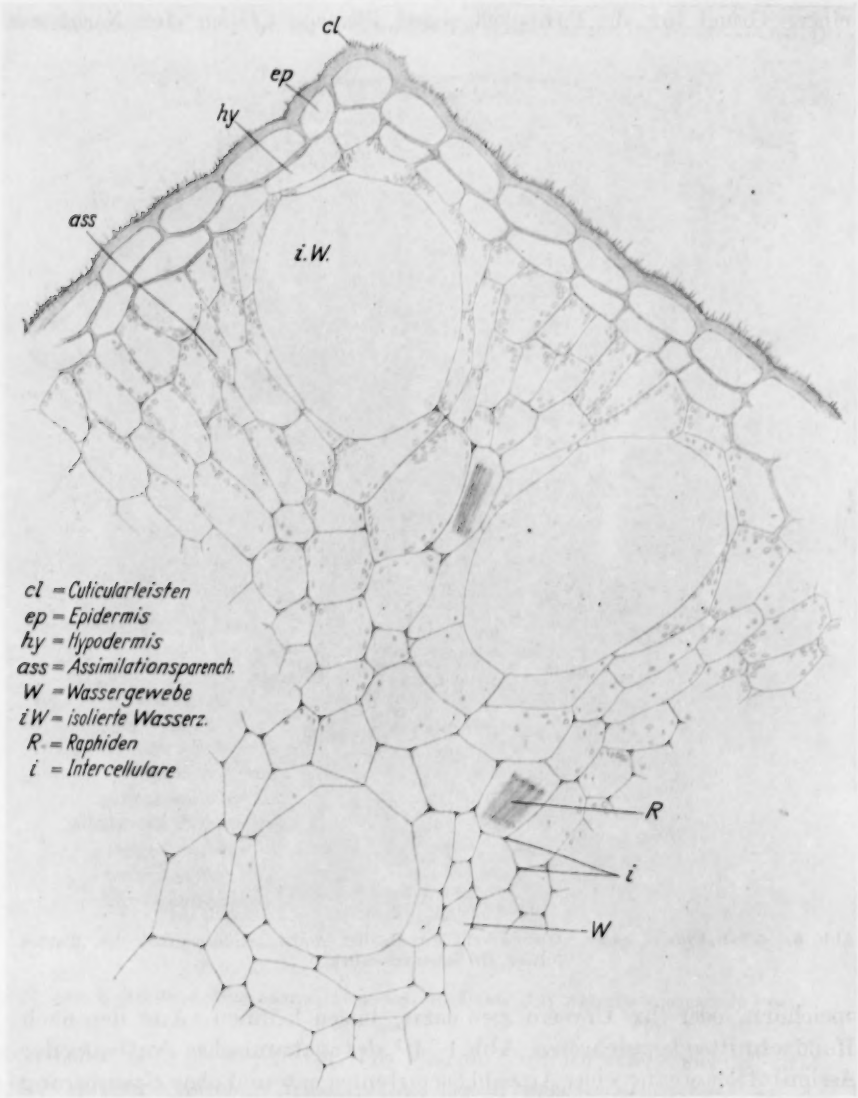


Abb. 5. *Faucaria duncanii*. Blattquerschnitt (mit De Saussure-Effekt)

und *Nidularium mayendorffii* eine CO_2-Speicherung, *Aechmea* dagegen nicht. *Peperomia* (*Piperaceae*) zeigt ebenfalls trotz der dicken Blätter keinen De Saussure-Effekt. Dasselbe gilt für *Columnea*, *Zebrina pendula*

und *Drosera binata* sowie die dünnblättrigen *Asplenium nidus*, *Eucalyptus*, *Fragaria*, *Saxifraga sarmentosa* und *Sinningia*.

Möglicherweise hätten nun anatomische Unterschiede im Blattbau einen Grund für die Fähigkeit einer Pflanze, CO_2 in der Nacht zu

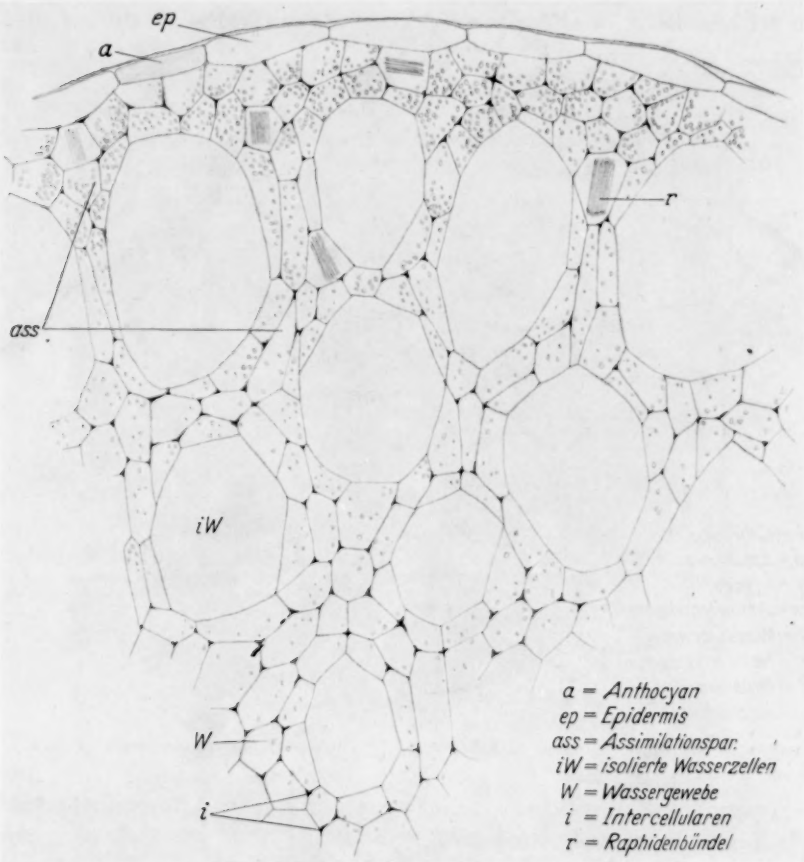


Abb. 6. *Glottiphyllum suave*. Querschnitt durch den Assimilationsmantel des Blattes (ohne De Saussure-Effekt)

speichern, oder ihr Unvermögen dazu, bilden können. Aus den nach Handschnitten gezeichneten Abb. 1—9[1] des anatomischen Aufbaues der Assimilationsorgane einer Anzahl Succulenten mit und ohne Speicherung ist aber ersichtlich, daß dieses nicht der Fall ist. Es sind keine in die Augen fallenden Differenzen vorhanden, aus denen auf das Vorhandensein des Speicherungsvermögens geschlossen werden könnte, sofern man von der unterschiedlichen Organdicke absieht (s. oben).

[1] Die Schnitte und Zeichnungen wurden dankenswerterweise von Fräulein GISELA BRINK angefertigt.

Im allgemeinen sind alle untersuchten Assimilationsorgane dadurch charakterisiert, daß man kein eigentliches Palisadengewebe findet, wohl aber große Intercellularen. Ferner kommen die Chloroplasten in dem assimilierenden Gewebe bzw. den für die Speicherung in Frage kommen-

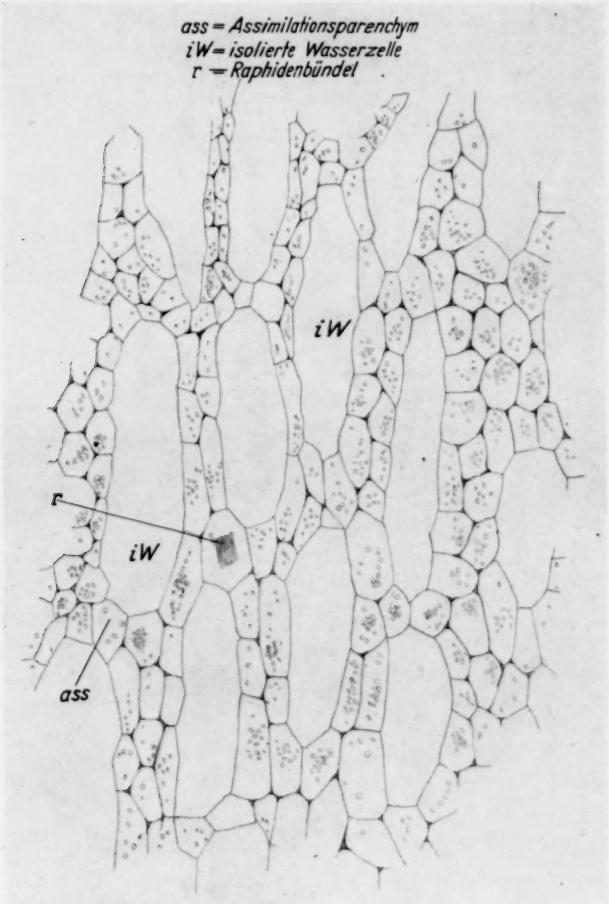


Abb. 7. *Glottiphyllum suave*. Längsschnitt durch das Assimilationsparenchym

den Zellen sehr zerstreut vor. Ob sich die vielfach vorhandenen, praktisch chlorophyllfreien Wasserzellen der *Mesembryanthemaceae* an der Speicherung von Malat beteiligen, bleibe dahingestellt. Ein gewisser Chlorophyllgehalt in den Zellen muß wohl anwesend sein, um sie zur Speicherung zu befähigen. Jedenfalls weisen solche Pflanzen wie *Zebrina pendula*, die nur große wasserhaltige Epidermiszellen ohne Chlorophyll besitzen oder diejenigen Orchideen, die zwar Pseudobulben haben, deren Blätter aber relativ dünn sind, keinen De Saussure-Effekt auf.

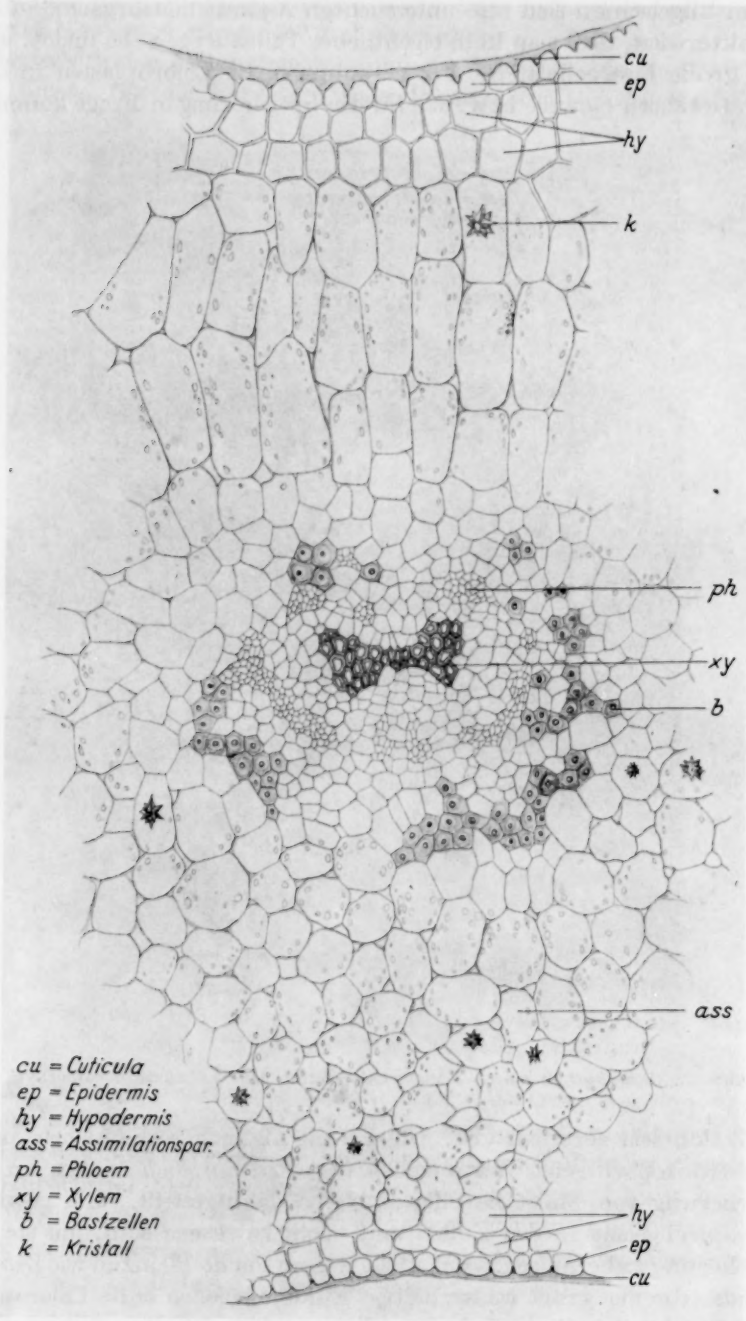


Abb. 8. *Hoya carnosa.* Blattquerschnitt (mit De Saussure-Effekt)

An dieser Stelle sind auch diejenigen Pflanzenarten zu erwähnen, die nach BORGSTRÖM (1934, 1938) ihren diurnalen Säurestoffwechsel nicht auf der Basis von l-Äpfelsäure, sondern von d-Isocitronensäure ausführen (vgl. NUERNBERGK 1957, S. 210). Bei einigen Vertretern dieser

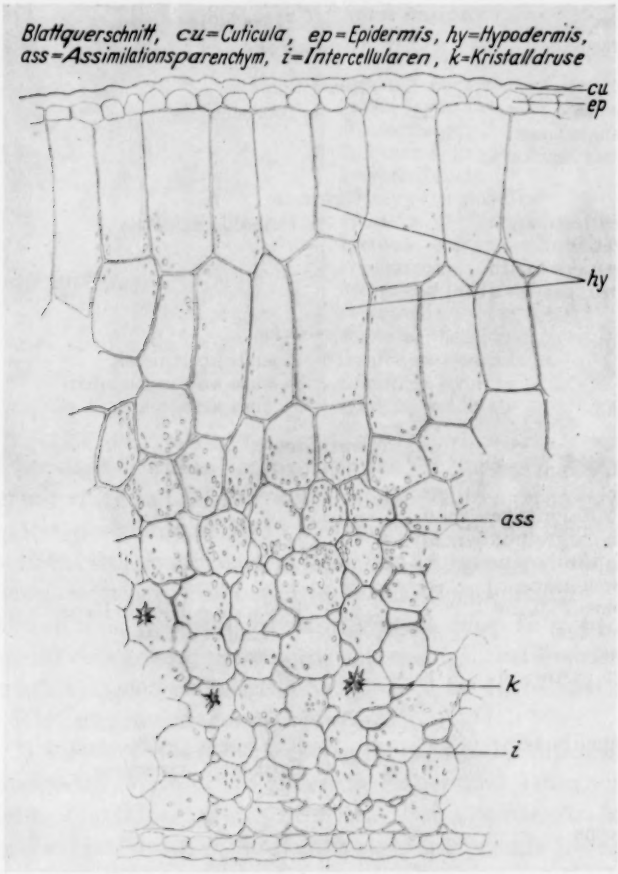


Abb. 9. *Hoya bella*. Blattquerschnitt (ohne De Saussure-Effekt)

physiologischen Gruppe, wie *Sedum dendroideum*, *S. maroccanum*, *Kleinia amaniensis*, *K. anteuphorbium* und *K. articulata* prüfte ich den CO_2-Stoffwechsel, doch war keinerlei Kohlendioxydspeicherung im Dunkeln zu beobachten. Quantitativ scheint eine etwaige CO_2-Speicherung in Form von d-Isocitronensäure nur von untergeordneter Bedeutung für den CO_2-Gesamtstoffwechsel zu sein. Das ergibt sich auch aus den Versuchen von VICKERY (1959). Ob *Aloe arborescens*, welche nach BORGSTRÖM (1934b) viel Citrat enthält und trotzdem stark speichert (NUERNBERGK 1955a), eine Ausnahme bildet, bleibe vorerst dahingestellt.

Tabelle I
Das Vorkommen des De Saussure-Effektes

Pflanzenarten mit nächtlicher CO_2-Speicherung	Pflanzenarten ohne nächtliche CO_2-Speicherung
Asclepiadaceae	
Hoya carnosa	Hoya bella
Stapelia variegata	
Bromeliaceae	
Billbergia nutans	Aechmea
Neoregelia ampullacea	
Nidularium mayendorffii	
Cactaceae	
Echinopsis eyriesii var.	Peireskia aculeata
Mamillaria rhodantha	
Phyllocactus pfersdorffii	
Zygocactus truncatus	
Compositae	
	Kleinia amaniensis
	Kleinia anteuphorbium
	Kleinia articulata
Crassulaceae	
Bryophyllum crenatum	
Bryophyllum crenatum × daigremontianum	
Bryophyllum daigremontianum	
Bryophyllum tubiflorum	
Echeveria kircheriana	
Kalanchoe blossfeldiana (Kurztagblätter)	Kalanchoe blossfeldiana (Langtagblätter)
Kalanchoe welwitchii	Sedum dendroideum
Sempervivum tectorum	
Euphorbiaceae	
Euphorbia grandidens	Euphorbia pulcherrima
	Euphorbia splendens
Liliaceae	
Aloe arborescens	
Aloe aristata	
Gasteria verrucosa	
Sanseviera trifasciata	
Mesembryanthemaceae	
Bergeranthus multiceps z. T.	Bergeranthus multiceps z. T.
Faucaria hybrida (Faucaria coronata × F. armstrongii)	Gibbaeum shandii
	Glottiphyllum herrei
	Oscularia deltoides
Orchidaceae	
Cattleya labiata var.	Cymbidium lowianum
Epidendrum ellipticum	Coelogyne cristata
Epidendrum schomburgkii	Paphiopedilum insigne
Encyclia atropurpurea	Thunia marshalliana
Schomburgkia crispa	

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Pflanzenarten mit nächtlicher CO_2-Speicherung	Pflanzenarten ohne nächtliche CO_2-Speicherung
Verschiedene Familien	
	Asplenium nidus
	Avena sativa
	Begonia hybrida „Gloire de Lorraine"
	Brassica oleracea var. gongylodes
	Coleus hybridus
	Columnea
	Cucumis sativus
	Drosera binata
	Eucalyptus globulus
	Fragaria
	Lactuca sativa
	Peperomia
	Nicotiana tabacum
	Peperomia
	Primula obconica
	Saxifraga sarmentosa
	Sinningia hybrida
	Zebrina pendula

Eine Übersicht über das Vorkommen des De Saussure-Effektes bei den bisher von mir mit dem URAS untersuchten Pflanzenarten gibt Tabelle 1.

Fassen wir noch einmal das in diesem Abschnitt Gesagte zusammen, so ergibt sich, daß zwar eine gewisse Succulenz der assimilierenden Organe Voraussetzung für eine nächtliche CO_2-Speicherung ist, im übrigen aber nicht notwendigerweise zu einer Speicherung führen muß. Hier dürfte nun die dritte Bedingung, eine unterschiedliche Permeabilität des Cytoplasmas samt seiner Grenzflächen für CO_2 bei Licht und Dunkelheit mit ihrer Wirkung einsetzen.

Zu 3. Bei Succulenten ist der Weg für das Kohlendioxyd zwischen den Chloroplasten, Wasser speichernden Zellen und Intercellularen besonders groß. Das CO_2 muß erheblich mehr Plasmaschichten bzw. -grenzflächen im Verlaufe des CO_2-Stoffwechsels passieren als bei nicht succulenten Blättern. Daher können die vom Licht verursachten Permeabilitätsänderungen des Plasmas und seiner Grenzflächen den Prozeß der Kohlendioxydaufnahme und -abgabe stark beeinflussen.

Einen starken Ausdruck finden diese Permeabilitätsänderungen bei plötzlichen Übergängen von Licht zu Dunkelheit und umgekehrt. Es treten dann charakteristische Sprünge in den CO_2-Stoffwechselkurven auf, die ich seinerzeit (1955b, S. 74ff., S. 83) schon beschrieben und mit den Befunden anderer Autoren verglichen habe (1955b, S. 86).

Parallelen zu diesen Erscheinungen findet man bei den Lichtwachstumsreaktionen der Blätter und anderen reizphysiologischen Vorgängen (s. NUERNBERGK 1955b, S. 86ff., 1957, S. 218ff.). Besonders bei den

Variationsbewegungen dürften die durch Licht/Dunkelwechsel induzierten Permeabilitätsänderungen im Gewebe der mit dicken Parenchymwülsten ausgestatteten Blattgelenke zur Entstehung dieser Bewegungen beitragen.

Wenn sich im übrigen der diurnale CO_2-Stoffwechsel in mit großen Vacuolen versehenen Blattorganen besonders stark manifestiert, so ist das vielleicht ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der Weglänge, die das Kohlendioxyd in succulenten Blattorganen bis zu den Orten seiner chemischen Umwandlung zurückzulegen hat. Verdunkelungsversuche mit einzelnen Blattpaaren ergaben nämlich bei *Bryophyllum daigremontianum*, daß an der Periodizität des CO_2-Stoffwechsels weit überwiegend die unteren Blattpaare beteiligt sind (Abb. 12). Die Abschirmung dieser Blätter vor Licht mit schwarzem Papier führt zu einer starken Verkleinerung der Ausschläge der CO_2-Stoffwechselkurven. Diese Feststellung stimmt ganz mit der Hauptbeteiligung der älteren Blätter am CAM überein. Möglich wäre es freilich auch, daß die jüngeren Blätter nur deshalb mangelhaft reagieren, weil sie nur kleine Vacuolen besitzen und deshalb nicht genügend Malat speichern können.

Die Tatsache, daß vor allem bei manchen *Mesembryanthemaceae* trotz Blattsucculenz kein De Saussure-Effekt zu beobachten ist, steht m. E. mit der von mir angenommenen Bedeutung des Permeabilitätsfaktors für das Zustandekommen dieses Effektes nicht in Widerspruch. So gibt es ja auch nahe verwandte Pflanzenarten mit Blattgelenken, von denen einige nyctinastische Bewegungen ausführen, andere aber nicht (HANSGIRG 1890; vgl. auch GOEBEL 1924). Auch reagieren lange nicht alle Blätter so empfindlich auf Licht und Dunkelheit wie diejenigen von *Mimosa pudica* oder *Phaseolus*. In allen diesen Fällen dürfte eine sehr unterschiedliche Empfindlichkeit der Permeabilität der betreffenden Zellen gegenüber dem Wechsel von Licht und Dunkelheit vorliegen, und bei dem periodischen CO_2-Stoffwechsel braucht daher grundsätzlich nicht daran gedacht zu werden, daß dessen Chemismus in dem einen Falle wohl, in dem anderen aber nicht auf die Bildung und Speicherung größerer Malatmengen eingerichtet ist.

III. Der Einfluß des endogenen 24 h-Rhythmus auf die Gestalt der CO_2-Stoffwechselkurven

Die Parallelität zwischen dem periodischen CO_2-Stoffwechsel und dem Ablauf der Variationsbewegungen der Blätter bezieht sich auch auf die endogenen Komponenten, denen alle diese Vorgänge neben der aitionomen Steuerung durch den Licht/Dunkelwechsel unterliegen. So entspricht den in der Regel im 24 h-Rhythmus bei Dauerlicht sich abspielenden Blattbewegungen ein gleicher Rhythmus der CO_2-Aufnahme und -Abgabe bei den Kohlendioxyd speichernden Pflanzenarten.

Früher glaubte ich (1957, S. 213, 223), daß zwischen dem Rhythmus des Kohlendioxyd-Stoffwechsels im Dauerlicht als spezifischer Erscheinung und der Fähigkeit zur nächtlichen CO_2-Fixierung zu unterscheiden und z. B. bei der Kohlendioxyd-Speicherung der Orchideen keine endogene Komponente vorhanden sei. Nach neueren Untersuchungen trifft dies aber nicht zu. *Alle* von mir untersuchten Pflanzenarten einschließlich der *Orchidaceae* weisen bei Dauerlicht einen endogenen 24 h-CO_2-Stoffwechsel-Rhythmus auf, *sofern* sie den De Saussure-Effekt zeigen. Der Rhythmus ist zwar je nach der Species unterschiedlich und teilweise nur schwach ausgeprägt, doch ist er *immer* vorhanden. Ranson-Thomas (1960) haben diesen interessanten Aspekt der Erforschung des „Crassulaceen-Stoffwechsels" nicht berücksichtigt, da die von ihnen zitierten Autoren sich hiermit nicht abgegeben haben. Nur Wilkins (1959, 1960) beschreibt einen Atmungsrhythmus, der in gewisser Hinsicht mit dem von mir aufgefundenen Rhythmus zu vergleichen ist (s. S. 50).

Schon 1955 (Nuernbergk 1955b, S. 76) und 1957 (S. 216) trachtete ich danach, experimentell den 24 h-Rhythmus zu verändern. Hierzu wurden die Versuche mit dem 36 h-Rhythmus unternommen, da hierfür eine geeignete Schaltuhr zur Verfügung stand. Am meisten bemerkenswert war bei diesen Experimenten, daß sehr lange, d. h. mindestens 1—$1^1/_2$ Jahre lang im 36 h-Rhythmus kultivierte Pflanzen von *Bryophyllum daigremontianum* den De Saussure-Effekt nicht mehr zeigen, sondern ebenso wie normale Pflanzen *ohne* diurnalen Rhythmus bei Licht CO_2 aufnehmen und bei Dunkelheit CO_2 abgeben (vgl. das oben Gesagte und S. 46). Es war also nicht möglich, einen regelrechten 36 h-Rhythmus des CO_2-Stoffwechsels zu erzielen.

Später wurden mit Hilfe der 36 h-Schaltuhr verschiedene weitere Licht/Dunkelwechsel-Versuche in ihrer Wirkung auf den CO_2-Stoffwechsel von *Bryophyllum daigremontianum* untersucht, von denen einer auf S. 56 noch genauer beschrieben werden wird. Am interessantesten war das Resultat eines Versuches mit einem Licht/Dunkelwechsel von $9:\underline{9}:9:\underline{9}$ h, der vom 23. 9.—9. 10. 58 lief. Es wurden für ihn Bryophyllen gebraucht, die vorher über 1 Jahr lang im 36 h-Rhythmus kultiviert worden waren. Die Beleuchtungsstärke betrug 36000 lx, der Luftdurchsatz 160—170 l/h und die Temperatur 23—26° C.

Die Versuchspflanzen begannen sofort einen auffälligen Rhythmus ihres CO_2-Stoffwechsels zu zeigen (s. Abb. 10). Bei Lichtbeginn war zunächst ein großer, zunehmender CO_2-„Aufnahmebogen" der Kurve, dann 5 h nach Lichtanfang ein umgekehrter CO_2-„Abnahmebogen" zu beobachten. Bei Beginn der Dunkelperiode war eine schwache „Zacke" in der Kurve zu sehen, verbunden mit CO_2-Aufnahme. In den ersten 2 Doppelperioden $= 2 \times 9:\underline{9}$ h fand während der Dunkelperiode überwiegend CO_2-Abgabe statt. Nach und nach hebt sich aber die Kurve in der

Dunkelperiode, und von Dunkelperiode 5 an ist im Dunkeln fast nur noch CO_2-Aufnahme vorhanden. In der folgenden Doppelperiode ist aber wieder Abnahme der CO_2-Aufnahme während der Dunkelperiode zu beobachten, dann wieder eine Zunahme derselben. In der 8.—9. Doppelperiode sieht man im Dunkeln eine starke CO_2-Aufnahme, ebenso in der 13., 17. und 21. Doppelperiode.

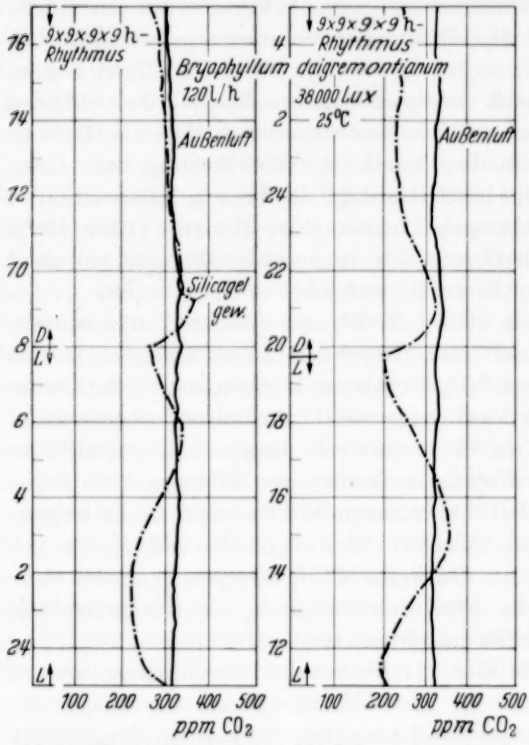


Abb. 10. CO_2-Stoffwechsel von 36 h-Pflanzen von *Bryophyllum daigremontianum* im $9 \times 9 \times 9 \times 9$ h Licht/Dunkelrhythmus. Links um 9 h Silicagel gewechselt. Ordinaten = Uhrzeit

Es ergibt sich also, daß dem $9 \times 9 \times 9 \times 9$ Licht-Dunkelrhythmus ein 24 h-Rhythmus überlagert ist.

Fällt die 9 : 9 h-Periode so, daß von 20—5 h oder von 2—11 h Dunkelheit herrscht, so ist die CO_2-Aufnahme während dieser Zeit (De Saussure-Effekt) maximal.

Fällt aber die Dunkelperiode in die Zeit von 8 bis 17 h, so ist die CO_2-Aufnahme im Dunkeln minimal bzw. es ist eine CO_2-Abgabe vorhanden. Die 2 gegenübergestellten 9 : 9 h-Kurven der Abb. 10, in der die Dunkelheit einmal in die Zeit von 8—17 h, das andere Mal in die Zeit von 20—5 h fällt, geben den Unterschied im Verlauf der Kurven deutlich wieder.

Dieser Versuch stimmt in seinem Ergebnis gut mit dem auf S. 56 noch zu beschreibenden Experiment, das zu einer anderen Jahreszeit ausgeführt wurde, überein. Im übrigen zeigen auch die beiden Abb. 5 und 6 aus meiner Arbeit von 1957, ein Maximum der CO_2-Aufnahme in den frühen Morgenstunden, niemals aber in den Mittagsstunden.

Meines Erachtens ist mit diesen Ergebnissen genügend erwiesen, daß in den Bryophyllen ein latenter 24 h-Rhythmus vorhanden ist, der auch durch sehr unterschiedliche Licht/Dunkel-Wechsel nicht beseitigt werden kann.

Unter geeigneten Bedingungen (s. unten) ist es praktisch nicht möglich, diesen 24 h-Rhythmus zum Verschwinden zu bringen. Anhaltspunkte darüber, wie bzw. ob überhaupt seine tägliche Regulierung

erfolgt, kann ich aus meinen bisherigen Experimenten nicht ziehen. In großen Zügen dürfte er ontogenetisch festgelegt sein wie ja auch eine Uhr für einen 24stündigen Tagesablauf eingerichtet ist, doch schließt dieses nicht die Notwendigkeit aus, daß von Zeit zu Zeit eine Regulierung auf den täglichen Tag- und Nachtwechsel erfolgen muß. Dagegen hat die Annahme Bünnings (1959, 1960) manche Wahrscheinlichkeit für sich, daß der 24stündige CO_2-Stoffwechsel-Rhythmus irgendwie mit dem Rot/IR-Pigmentsystem gekoppelt ist.

In früheren Experimenten mit Dauerlicht konnte ich bei verschiedenen Pflanzenarten, vor allem *Bryophyllum daigremontianum*, stets wieder feststellen, daß der Rhythmus verhältnismäßig schnell abklingt, wenn zur Beleuchtung starkes Fluorescenzlicht mit viel Blauanteil benutzt wurde. Wurden z. B. Bryophyllen mit 20000 spez. lx = $\sim$6000 μW/cm² (s. Nuernbergk 1955b, S. 68) oder noch intensiverem Dauerlicht von Philips-HPL-Lampen bestrahlt, so flachten sich die Amplituden der CO_2-Stoffwechselkurven bald bis zu ihrem völligen Verschwinden ab. Ähnlich war bei *Kalanchoe welwitchii* nach 3wöchentlichem Dauerlicht mit 35000 lx HPL-Licht kein Rhythmus mehr zu erkennen. Betrug dagegen die Intensität des Dauerlichtes nur 5000 lx spez. lx = $\sim$15000 μW/cm², so war der CO_2-Stoffwechsel-Rhythmus bei *Bryophyllum* ohne merkliche Abschwächung viele Wochen lang zu beobachten.

Benutzte ich nun aber Natrium-Dampflicht (etwa 1000 μW/cm²), das nur sehr wenig Blau enthält, und zu 85% die Wellenlängen 589/950 nm emittiert, so konnte ich den Rhythmus noch nach 2—3 Monaten Dauerlicht nicht zum Verschwinden bringen, vielmehr lief er mit konstanter Stärke weiter.

Die Rot absorbierende Pigmentform scheint also den Rhythmus zu begünstigen, die IR und Blau absorbierende Form ihn dagegen zu hemmen, was mit dem Wirkungsspektrum der „Hochenergiereaktion" (vgl. Mohr 1959) übereinstimmt.

Auch bei den Variationsbewegungen dürfte eine schwächere Blaustrahlung fördernd auf die Aufrechterhaltung des endogenen Rhythmus einwirken. So verwendeten Bünning-Schöne-Schneiderhöhn (1957) als Dauerlichtquelle bei ihren Versuchen mit *Phaseolus*-Blättern nur eine 40 W-Tageslicht-Leuchtstofflampe, die 1 m über den Pflanzen angebracht war (vgl. Bünning 1956b). Hiermit dürften am Standort der Pflanzen nur etwa 150—200 lx erreicht werden, und doch zeigt Abb. 4a der beiden Autoren, daß die Blattbewegungen nach 5—6 Tagen noch unvermindert fortgehen. Die Befunde von Bünning-Lörcher (1957), nach denen hellrotes Licht (etwa 610—690 nm) die Dauer der endogenen periodischen Variationsbewegungen verlängert und die Periodenlänge besonders beeinflußt, bieten ebenfalls eine Parallele zu dem oben

geschilderten Verhalten des De Saussure-Effekts (=CAM) in verschiedenfarbigem Licht. Die beiden Autoren glauben, daß auch hier die Regulierung durch Mitwirkung der Rot/IR-Pigmentsysteme zustande kommt. In unserem Falle kann man sich die Verhältnisse allerdings auch so gelagert vorstellen, daß die endogene plasmatische Permeabilitätskomponente durch kurzwellige Strahlung analog zum Phototropismus stark gestört bzw. unterdrückt wird, während langwelliges Licht sie mehr oder weniger unbeeinflußt läßt.

Während bei den Variationsbewegungen, wenn diese nach längerer Versuchsdauer im Dauerdunkel nachlassen, eine „Ankurbelung" der endogenen 24 h-Periode durch vorübergehend im 24 h-Rhythmus gegebene Lichtimpulse, z. B. 1 h Licht auf 23 h Dunkelheit, zu einem längeren Andauern der periodischen Bewegungen führt, erreicht man mit dem spiegelbildlichen Modus bei den endogenen CO_2-Stoffwechselrhythmen von *Bryophyllum daigremontianum* nicht den gleichen Erfolg. Hier wird vielmehr, wenn man z. B. das Dauerlicht in 24-stündigem Abstand durch 1 h Dunkelheit unterbricht, d. h. auf 23 h Licht 1 h Dunkelheit gibt, nicht etwa die Gesamtdauer des endogenen 24 h-Rhythmus verlängert, sondern der sonst übliche Ablauf dieses Rhythmus verändert: während der einstündigen Dunkelperiode tritt ein kurzzeitiges Unterschreiten des Kompensationspunktes ein, dem ein langsamer Anstieg der Photosynthesekurve bis zur nächsten Lichtunterbrechung folgt. Diese Erscheinung beobachtet man sogar bei Na-Dampfbeleuchtung (Abb. 11), die besonders geeignet für die Aufrechterhaltung des endogenen Rhythmus ist (s. oben).

Vielleicht induziert die Unterbrechung der Lichtzufuhr eine Störung der sonst im Dauerlicht sich rhythmisch abspielenden Permeabilitätsänderungen. Im übrigen kann man dieses Versuchsergebnis mit einer anderen Erscheinung in Parallele bringen, die sich auf den CO_2-Stoffwechsel der im 36 h-Licht/Dunkelwechsel (z. B. 20:16 h) aufgewachsenen Bryophyllen bezieht. Diese Bryophyllen, welche sich wie normale Pflanzen verhalten und im Dunkeln keine oder fast keine CO_2 mehr speichern (s. NUERNBERGK 1957, S. 216, 217), zeigen nämlich beim plötzlichen Übergang von (Kunst-)Licht zu Dunkel und umgekehrt auch nicht mehr die charakteristischen, auf S. 41 erwähnten Kurvenausschläge, die sonst für alle CO_2-speichernden Pflanzen typisch sind, wenn diese im Laboratorium mit Kunstlicht behandelt werden (vgl. NUERNBERGK 1955a, S. 395 und 1955b, S. 74ff.). Bei den 1957 (Abb. 5 und 6) wiedergegebenen Kurven, wo der CO_2-Stoffwechsel von 36 h-Bryophyllen bei einem Licht/Dunkel-Wechsel von 12:24 h bzw. 24:12 h beschrieben wurde, sind zwar bei den Licht/Dunkel-Übergängen und vice versa noch kleine Kurvensprünge vorhanden, doch befanden sich die Versuchspflanzen erst etwas über 1 Jahr im 36 h-Rhythmus. Dagegen zeigt eine vom

8. 8. 57 datierte Kurve für einen Licht/Dunkel-Rhythmus von 20:16 h keinerlei Kurvensprünge mehr. Seit den erwähnten älteren Kurven waren die Bryophyllen aber inzwischen 18 Monate länger im 36 h-Rhythmus kultiviert worden.

Meines Erachtens kann bei derartigen Bryophyllen das CO_2-Speicherungssystem praktisch nicht mehr in Aktion treten, weil die starke Störung des endogenen Rhythmus-Systems durch die aufgezwungene 36 h-Periode den unterschiedlichen Einfluß von Licht und Dunkelheit auf die Permeabilität der betreffenden Speicherzellen mehr oder weniger unterdrückt hat. Die Permeabilität dürfte sich daher sowohl im Licht als auch im Dunkeln nicht oder kaum ändern. Allerdings ergibt ein Licht/Dunkel-Wechsel im 9:9:9:9 h-Rhythmus, wie wir gesehen haben (S. 43), wiederum sehr wohl rhythmische CO_2-Stoffwechselkurven, die auch mit „Kurvensprüngen" verbunden sind. Dieses Verhalten erinnert an die eigenartige Reaktionsweise von Tomatenblättern, wo nach den Angaben von Bonde (1955) und Hillman (1956) Cyclen von 4:4 h, 12:12 h und 16 bis 20:8—4 h keinerlei Chlorophyllschäden hervorrufen, dagegen die Cyclen 8:4 h, 11:4 h, 14:4 h und bei konstanter Temperatur auch der Cyclus 6:6 h chlorophyllschädigend wirken.

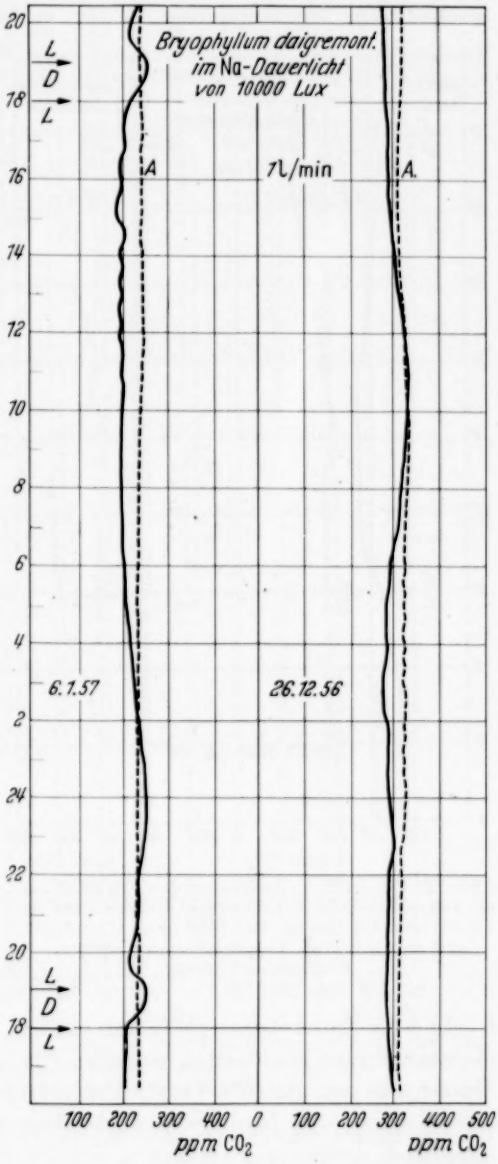


Abb. 11. CO_2-Stoffwechsel von *Bryophyllum daigremontianum* im Natriumdampf-Dauerlicht (etwa 2370 μW/cm^2) bei einstündiger Unterbrechung der Beleuchtung. Ordinate = Uhrzeit

Neben dem endogenen 24 h-Rhythmus „normaler" Pflanzen weist *Bryophyllum* noch einen endogenen Jahresrhythmus auf (vgl. BÜNNING 1956a und OVERBECK 1957). Dieser äußert sich in einer jahreszeitlich wechselnden Speicherfähigkeit für Kohlendioxyd und einem damit variierenden Vermögen zur schnelleren oder langsameren Umstellung des Rhythmus auf andere Licht/Dunkelperioden. Nach den von mir (1955b, S. 79ff.) beschriebenen CO_2-Stoffwechselkurven ist die Speicherfähigkeit im Frühjahr — genauer von etwa Dezember bis April — geringer als im Sommer (ab Mitte Mai) und Herbst, obwohl die natürlichen Strahlungsintensitäten im Frühjahr höher als im Herbst sind. Eine Analogie zu dieser Erscheinung bildet das Reaktionsvermögen der *Avena*-Koleoptile auf Wuchsstoff, das ebenfalls von November bis April verringert ist.

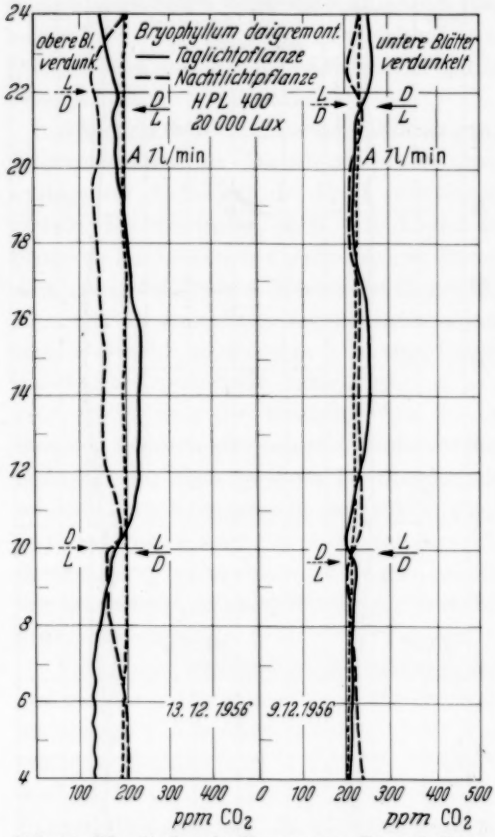


Abb. 12. CO_2-Stoffwechselkurven von *Bryophyllum daigremontianum* im normalen und spiegelbildlichen Licht/Dunkelrhythmus im Dezember (13. 12. 56) und mit partieller Verdunklung der Blätter. Ordinate = Uhrzeit

Die eben erwähnte, durch die starke endogene Komponente bedingte Variabilität in der Umstellung auf andere Beleuchtungsrhythmen ist aus folgenden Versuchsergebnissen ersichtlich: Bestrahlt man *Bryophyllum*-Pflanzen im Sommer oder Herbst von 18—8 h und läßt sie von 8—18 h im Dunkeln, so paßt sich die CO_2-Stoffwechselkurve schnell an die veränderten Lichtzeiten an (Abb. 12; vgl. auch NUERNBERGK 1955a). Macht man den gleichen Versuch im zeitigen Frühjahr, so dauert es mehrere Wochen (~5), bis die Stoffwechselkurven einigermaßen spiegelbildlich gegenüber denjenigen verlaufen, welche die Pflanzen im Licht/Dunkelwechsel von 8—18 h/18—8 h machen (Abb. 13). Die Umstellung ist jetzt ferner nicht ganz vollständig und die CO_2-Abgabe in der Lichtperiode von 18—8 h weniger stark als bei Pflanzen im normalen Rhythmus. Meist

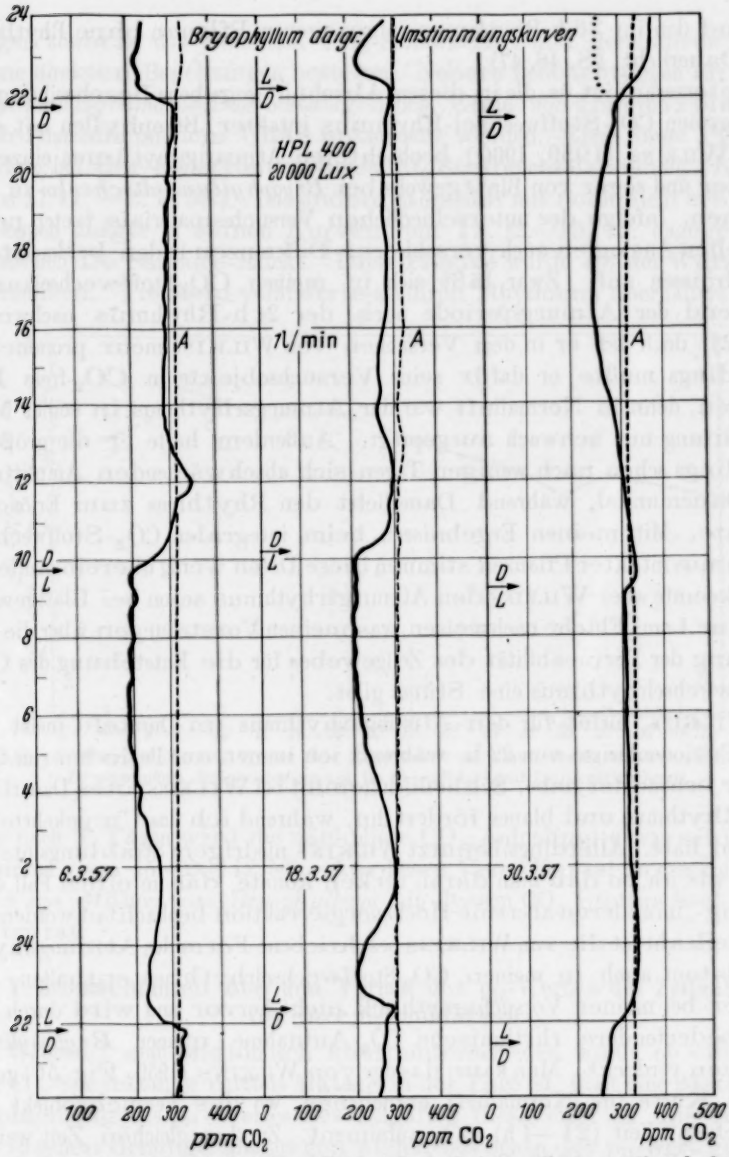


Abb. 13. CO_2-Stoffwechselkurven von *Bryophyllum daigremontianum* während der Umstimmung auf den umgekehrten Licht/Dunkelrhythmus 22—10/10—22 h im März (6. 3. bis 30. 3. 57). Ordinate = Uhrzeit

zeigen sie, besonders die im Frühjahr auf Nachtbestrahlung umgestimmten Bryophyllen, bei anschließender Dauerbeleuchtung mit starkem Fluorescenzlicht (HPL-Lampen) keinen endogenen Rhythmus mehr, sondern nehmen gleichmäßig konstant CO_2 auf. Sie ähneln damit weit-

gehend den im 36 h-Rhythmus aufgezogenen Pflanzen ohne Rhythmus im Dauerlicht (S. 46, 47).

Interessant ist es, die in diesem Abschnitt gegebene Beschreibung des endogenen CO_2-Stoffwechsel-Rhythmus intakter Bryophyllen mit dem von WILKINS (1959, 1960) beobachteten Atmungsrhythmus einzelner Blätter und sogar von Blattgewebe bei *Bryophyllum fedtschenkoi* zu vergleichen. Infolge des unterschiedlichen Versuchsmaterials treten neben manchen Analogien auch verschiedene Differenzen in den beiderseitigen Ergebnissen auf. Zwar läßt sich in meinen CO_2-Stoffwechselkurven während der Atmungsperiode auch der 24 h-Rhythmus nachweisen (S. 62), doch ist er in den Versuchen von WILKINS mehr prononciert. Allerdings mußte er dafür seine Versuchsobjekte in CO_2-freie Luft bringen, denn in Normalluft war der Atmungsrhythmus in seiner Meßanordnung nur schwach ausgeprägt. Außerdem hatte er die größten, allerdings schon nach wenigen Tagen sich abschwächenden Amplituden im Dauerdunkel, während Dauerlicht den Rhythmus zum Erlöschen brachte. Mit meinen Ergebnissen beim integralen CO_2-Stoffwechselrhythmus intakter Pflanzen stimmen diese Daten wenig überein. Andererseits konnte aber WILKINS den Atmungsrhythmus schon bei Blattgewebe von nur 1 cm^2 Fläche nachweisen, was meinen Vorstellungen über die Bedeutung der Permeabilität des Zellgewebes für die Entstehung des CO_2-Stoffwechselrhythmus eine Stütze gibt.

WILKINS findet für den Atmungsrhythmus im Dunkeln meist nur eine Periodenlänge von 22 h, während ich immer nur Perioden von 24 h Dauer beobachtet habe. Schließlich hemmt bei WILKINS rotes Dauerlicht den Rhythmus und blaues fördert ihn, während ich das Umgekehrte gefunden habe. Allerdings benutzt WILKINS niedrigere Strahlungsintensitäten als ich, so daß man daran denken könnte, daß im einen Fall eine Niedrig-, im anderen aber eine Hochenergiereaktion beobachtet worden ist.

Vielleicht ist die von WILKINS beschriebene Form des Atmungsrhythmus latent auch in meinen CO_2-Stoffwechselrhythmen enthalten, nur tritt er bei meiner Versuchsmethodik nicht hervor und wird durch die viel bedeutendere rhythmische CO_2-Aufnahme meiner *Bryophyllum*-Pflanzen verdeckt. Man kann das der von WILKINS (1959, Fig. 5C) gegebenen Kurve für Normalluft entnehmen, wo das Versuchsobjekt zur „üblichen" Zeit (21—4 h) CO_2 aufnimmt. Zu der gleichen Zeit weisen WILKINS Kurven 1959, Fig. 5A, B; 1960, Fig. 2 in CO_2-freier Luft ein Minimum der Atmung, d. h. CO_2-Abgabe auf.

IV. CO_2-Stoffwechsel und Blühzustand

Während nach den von RANSON-THOMAS (1960) zitierten Autoren der CAM einen Einfluß auf die Blütenbildung ausübt bzw. durch diese beeinflußt wird, hatte ich bereits 1957 (S. 228) bei *Kalanchoe blossfeldiana*

zeigen können, daß zwischen CO_2-Stoffwechsel und generativer Phase keine direkten Beziehungen bestehen. Neuere Beobachtungen an *Bryophyllum daigremontianum* bestätigen dies. Ende 1958 konnten 2 blühende 24 h-Pflanzen mit dem URAS untersucht werden. Eine dieser Pflanzen atmete bei der Registrierung ihres CO_2-Stoffwechsels ständig (Kurven vom 27. 11.—2. 12. 58). Das andere Exemplar mit noch nicht erblühten Knospen zeigte in seinen Kurven vom 11. 12.—15. 12. dagegen den typischen De Saussure-Effekt. Diese Pflanze wurde an der Wurzel abgeschnitten. Trotzdem veränderte sie ihren Rhythmus überhaupt nicht,

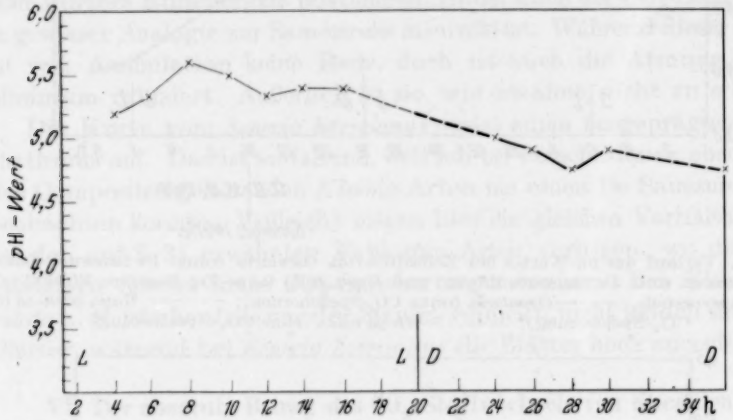


Abb. 14. Verlauf des p_H-Wertes des Zellsaftes von adaptierten 36 h-Pflanzen von *Bryophyllum daigremontianum* im 20—16 h Licht/Dunkelrhythmus

nur nach 3 Tagen wird die nächtliche CO_2-Aufnahme etwas schwächer (Kurven vom 15.—20. 12. 58). Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß auch das Blühen von *Bryophyllum* mit dessen CO_2-Stoffwechsel nichts zu tun hat.

V. Beobachtungen über den Verlauf des p_H-Wertes des Zellsaftes von Succulentenblättern

Während man anatomisch kaum unterscheiden kann, ob ein Blatt zur CO_2-Speicherung mittels Malates in der Lage ist, läßt eine 24stündige Beobachtung des p_H-Wertes des Zellsaftes dieses eher zu. Die Abb. 14 bis 16 geben derartige Messungen wieder, bei denen der p_H-Wert geringer Mengen ausgepreßten Zellsaftes elektrometrisch bestimmt wurde. Soweit URAS-Kurven für die betreffenden Pflanzenarten vorliegen, ist eine befriedigende Parallelität zwischen den Ergebnissen beider Methoden vorhanden. Ich erwähne z. B. die Kurve für *Hoya carnosa*, die im Unterschied zur Kurve von *Hoya bella* starke Schwankungen im diurnalen Säurewert erkennen läßt, was mit dem Vermögen zur CO_2-Speicherung übereinstimmt. Analog weist der p_H-Wert des Zellsaftes bei adaptierten

36 h-Pflanzen von *Bryophyllum daigremontianum* nur geringe Schwankungen auf, was mit ihrem Verhalten bei der URAS-Analyse übereinstimmt (s. S. 56).

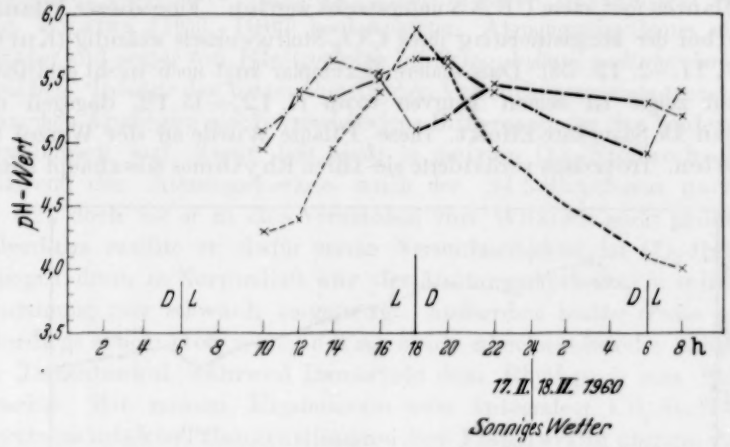


Abb. 15. Verlauf des pH-Wertes des Zellsaftes von *Oscularia* (ohne De Saussure-Effekt), *Hoya carnosa* (mit De Saussure-Effekt) und *Hoya bella* (ohne De Saussure-Effekt). Gewächshausversuch. ——— *Oscularia* (ohne CO_2-Speicherung); – – – – – – *Hoya carnosa* (mit CO_2-Speicherung); —·—·— *Hoya bella* (ohne CO_2-Speicherung)

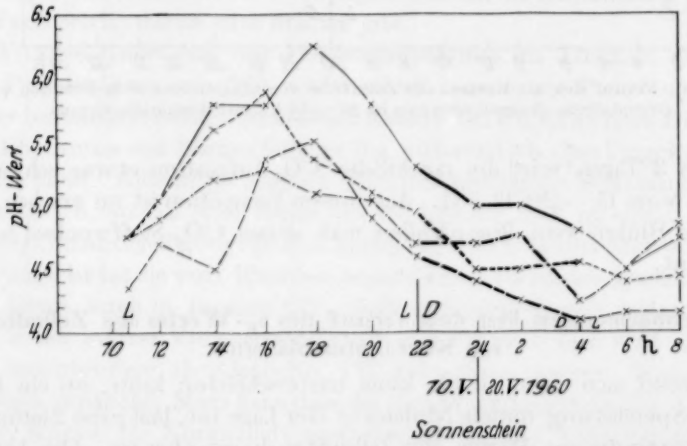


Abb. 16. Verlauf des pH-Wertes des Zellsaftes von *Aloë arborescens* (mit De Saussure-Effekt), *Senecio herreianus*, *Epidendrum ellipticum* (mit De Saussure-Effekt) und *Vanilla*. Gewächshausversuch. —·—·— *Aloë arborescens*; ——— *Senecio herreianus*; ——— *Epidendrum ellipticum*; – – – – – – *Vanilla aromatica*

Bei 2 pH-Wert-Kurven, nämlich denen von *Senecio herreianus* und *Vanilla aromatica* liegen noch keine URAS-Kurven vor, aus denen man ersehen könnte, ob hier gleichfalls die Parallelität zwischen CO_2-Stoffwechsel und Verlauf des pH-Wertes des Zellsaftes gegeben ist. Von *Vanilla* erwähnten bereits WARBURG (1886) und BENDRAT (1929) eine

Lichtentsäuerung über Tag und eine Ansäuerung während der Nacht. Ich habe verschiedentlich versucht, CO_2-Stoffwechselkurven von *Vanilla* zu erhalten, doch zeigten die Versuchsobjekte jedesmal ein bei vielen Arten im URAS-Versuch häufig zu beobachtendes Verhalten: sie „taten nichts", d. h. die CO_2-Stoffwechselkurve zeigt nur eine mehr oder weniger konstante, äußerst geringe Atmung an. Man kann dieses Verhalten sehr oft wahrnehmen, ohne daß man den Versuchspflanzen äußerlich ihre Stoffwechselruhe ansehen kann. Bei vielen mehrjährigen Pflanzen, wozu meine Versuchsobjekte ja durchgehend gehören, läßt sich eine längere oder kürzere Ruheperiode postulieren, in der auch der CO_2-Stoffwechsel in gewisser Analogie zur Samenruhe minimal ist. Während dieser Periode ist von Assimilation keine Rede, doch ist auch die Atmung auf ein Minimum reduziert. Äußerlich ist sie, wie erwähnt, nicht zu erkennen.

Die Kurve von *Senecio herreianus* weist einen ausgeprägten Säurerhythmus auf. Das ist auffallend, weil ich bei verschiedenen ebenfalls zu den Compositen gehörenden *Kleinia*-Arten nie einen De Saussure-Effekt beobachten konnte. Vielleicht mögen hier die gleichen Verhältnisse wie bei den auf S. 31 erwähnten *Euphorbia*-Arten vorliegen, wo die dünnblättrigen Species keine CO_2-Speicherung aufweisen. Bei *Kleinia articulata* z. B. ist ebenfalls nur der Stamm verdickt, nicht jedoch sind es die Blätter, während bei *Senecio herreianus* die Blätter hoch succulent sind.

VI. Der absolute Betrag des CO_2-Stoffwechsels von Succulenten

Will man den CO_2-Stoffwechsel der Succulenten unter *normalen* Verhältnissen richtig deuten, so ist die Kenntnis der absoluten Werte ihrer CO_2-Aufnahme und -Abgabe unerläßlich. In der Literatur konnte ich hierüber keine näheren Angaben finden, denn weder der Photosynthese-Band 5 des Handbuchs der Pflanzenphysiologie (1960) noch die von Rabinowitch (1951, S. 996ff.) gegebenen Tabellen über die maximale Photosynthese höherer Landpflanzen enthalten Succulentennamen.

Aus einer Zahl von *Bryophyllum*-Kurven, wo nach Versuchsabschluß Blattgröße und -trockengewicht bestimmt worden war, ließ sich aber der absolute Betrag der CO_2-Aufnahme und -Abgabe rechnerisch ermitteln. Es seien hier einige Daten für die *maximale* Aufnahme und Abgabe von CO_2 angeführt, die allein von besonderem Interesse sind, weil ja infolge der eigenartigen Gestalt der Stoffwechselkurven alle Werte vom Maximum bis zu 0 vertreten sein können.

Bryophyllum crenatum. Kurve vom 9. 4. 59, 25000 lx, 12 : 12 h Licht-Dunkelwechsel, 20° C.

Maximale CO_2-Aufnahme gegen Ende der Lichtperiode = 4,42 mg CO_2/h · dm^2 = 8,23 mg CO_2/h · g Trockengewicht.

Maximale CO_2-Abgabe = 1,6 mg CO_2/h · dm^2 = 2,99 mg CO_2/h · g Trockengewicht.

Bryophyllum daigremontianum. Kurve vom 25. 4. 59, 25000 lx, 12:12 h Licht/Dunkelwechsel, 20° C.

Maximale CO_2-Aufnahme in der Dunkelperiode = 5,66 mg CO_2/h · dm² = 7,04 mg CO_2/h · g Trockengewicht.

Maximale CO_2-Abgabe in der Lichtperiode = 1,7 mg CO_2/h · dm² = 2,11 mg CO_2/h · g Trockengewicht.

Unter besonderen Bedingungen kann die maximale CO_2-Aufnahme von *Bryophyllum daigremontianum* bedeutend höher als der oben angeführte Wert liegen. So wurde in den noch zu besprechenden Versuchen mit CO_2-freier Luft beobachtet, daß nach einem 14 h-Aufenthalt in CO_2-freier Luft während der gleichzeitigen Lichtperiode gegen Ende der darauffolgenden 10 h-Dunkelperiode in Normalluft eine maximale CO_2-Aufnahme von 11,27 mg CO_2/h · dm² = 10,88 mg CO_2/h · g Trockengewicht auftrat (Kurve vom 24./25. 6. 59).

Verglichen mit dem CO_2-Stoffwechsel anderer Pflanzenarten seien folgende Daten erwähnt, die mit meiner URAS-Apparatur, d. h. also unter vergleichbaren Verhältnissen ermittelt worden sind. So beträgt nach VILLWOCK (1959) die CO_2-Aufnahme von Flechtenarten (*Lecanora varia*, *Parmelia furfuracea* und *P. physodes*) bei 20000 lx 1,8—2,7 mg CO_2/h · g Trockengewicht. Für Tomaten und Gurken wurde von FEINDT (1960) bei einer maximale Assimilation gewährleistenden Beleuchtungsintensität von 28000—45000 lx und 25—27° C eine reelle Assimilation von 9,77 bzw. 10,18 mg CO_2/h · dm² = 39,73 bzw. 47,05 mg CO_2/h · g Trockengewicht bestimmt. HAMDORF (1959) fand bei ihren ebenfalls mit dem URAS ausgeführten Photosynthesebestimmungen für die apparente Assimilation von *Phaseolus*, Tomate, Kohlrabi und Spinat Raten von 7,95 (Bohne) bis 13,90 mg CO_2/h · dm².

Die Dunkelatmung wurde von FEINDT für Tomaten mit 1,22 und für Gurken mit 1,52 mg CO_2/h · dm² ermittelt.

Der CO_2-Stoffwechsel der Bryophyllen verläuft also im Normalfalle bedeutend intensiver als derjenige der Strauchflechten, erreicht aber doch nur etwa die Hälfte desjenigen von Tomaten, Gurken und Kohlrabi und $^2/_3$ des Stoffwechsels von *Phaseolus*, wenn man ihn auf die Blattfläche bezieht. Andererseits kann aber *Bryophyllum* im Sonderfall eine sehr hohe, der Tomate vollkommen vergleichbare CO_2-Aufnahme vollziehen.

Dieses deutet darauf hin, daß die Stomata bei Blattsucculenten vom Typus *Bryophyllum* keine besondere Bedeutung für den CO_2-Stoffwechsel besitzen (vgl. NUERNBERGK 1957, S. 225 und WILKINS 1959, S. 385).

Auf das Trockengewicht bezogen ist der *Bryophyllum*-CO_2-Stoffwechsel freilich nur klein gegenüber demjenigen der oben genannten Gemüsepflanzen, jedoch erheblich größer als der von Flechten. Die Ursache hierfür liegt zweifellos in dem großen Anteil von nicht assimilierender Substanz (Wassergewebe) bei *Bryophyllum* im Vergleich zu den Blättern von Gurke und Tomate.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der CO_2-Stoffwechsel von *Bryophyllum*, auf die Blattfläche bezogen, mit dem entsprechenden Stoffwechsel von Mesophytenblättern durchaus quantitativ vergleichbar ist, wie z. B. Daten von Boysen-Jensen (1932) zeigen, nach denen etwa die Lichtblätter von *Fagus* eine CO_2-Assimilation von 6,6, die Schattenblätter eine solche von 2,4 mg CO_2/h · dm² aufweisen.

VII. Das Verhältnis der CO_2-Aufnahme während der Photo- und Nyctoperiode bei Succulenten, insbesondere *Bryophyllum*

Ranson-Thomas vertreten in ihrem Bericht noch die These, der Ausgangspunkt für die Bildung der Äpfelsäure im Succulentengewebe seien *vorher* gebildete Hexosen, d. h. die Kohlenhydratbildung wird *vor* die Acidifizierung und nicht *hinter* die Acidifizierung gelegt (meine Hypothese; s. Nuernbergk 1957).

Die nachfolgenden Angaben bieten m. E. eine kräftige Stütze für meine Ansicht. Was die Versuche hierüber betrifft, sei hinzugefügt, daß die Versuchspflanzen bei der Untersuchung ihres CO_2-Stoffwechsels nach Möglichkeit die günstigsten Bedingungen hierfür vorfinden, d. h. in möglichst natürlichem Zustand untersucht werden. In vielen Fällen kann ich jetzt *Bryophyllum*-Pflanzen 14 Tage und länger in den Versuchsküvetten lassen, ohne daß sich ihre Reaktionseigenschaften nennenswert verändern.

Zunächst habe ich aufs Geratewohl einige Kurven hinsichtlich des Betrages der CO_2-Aufnahme und -Abgabe im Dunkeln und im Hellen analysiert. Die Methode besteht in einer Planimetrierung der Flächen, welche die Kurven oberhalb und unterhalb der Kompensationslinie (CO_2-Gehalt der in die Küvetten tretenden Außenluft) umschreiben. Die gemessenen Quadratzentimeter sind dann ein relatives Maß für die aufgenommenen und abgegebenen CO_2-Mengen, das man aber unschwer auf absolute Werte umrechnen kann, wenn man CO_2-Analysen, wie sie in Abschnitt VI beschrieben wurden, hinzufügt. Hier seien zunächst nur relative Werte angegeben.

Datum	Licht		Dunkel	
	CO_2-Aufnahme	CO_2-Abgabe	CO_2-Aufnahme	CO_2-Abgabe
13. 6. 58	50,5	—	45,4	—
14. 6. 58	55,4	—	39,5	—
15. 6. 58	38,4	3,3	57,9	—
16. 6. 58	25,0	4,0	41,0	—
17. 6. 58	15,5	3,0	31,0	—
18. 6. 58	44,0	—	42,5	—
	+ 228,8	− 10,3	+ 257,3	—
	− 10,3			
	+ 218,5			

CO_2-Stoffwechselkurven von *Bryophyllum daigremontianum* bei 35000 lx, 14 : 10 h Licht/Dunkelwechsel. Relative Werte für die CO_2-Aufnahme und -Abgabe, berechnet nach den Flächen der Kurven vom 13. 6.—18. 6. 58.

In der Nyctoperiode wurden 257,3 p CO_2 aufgenommen.
In der Photoperiode wurden 218,5 p aufgenommen, obwohl die Photoperiode 4 h länger als die Nyctoperiode dauerte.

Datum	Licht		Dunkel	
	CO_2-Aufnahme	CO_2-Abgabe	CO_2-Aufnahme	CO_2-Abgabe
19. 6. 58	37,3	1,2	30,3	—
20. 6. 58	25,0	—	30,8	—
21. 6. 58	33,0	3,3	33,0	—
22. 6. 58	29,0	2,0	29,0	—
23. 6. 58	13,0	5,2	30,0	—
24. 6. 58	39,6	3,1	34,8	—
25. 6. 58	37,1	2,5	36,5	—
26. 6. 58	33,6	0,8	30,5	—
27. 6. 58	25,8	0,1	30,5	—
	+273,4	−18,2	285,4	—
	− 18,2			
	+255,2			

Kurven vom 19. 6. bis 27. 6. 58. Gleiche Bedingungen und Pflanzen wie Tabelle S. 55.

In der Nyctoperiode wurden jetzt 285,4 p CO_2, in der Photoperiode 255,2 p CO_2 aufgenommen.

Die hier oben analysierten Kurven geben keineswegs ein besonders auffallendes Bild der CO_2-Aufnahme im Dunkeln.

Viel bedeutender ist diese z. B. nach der folgenden Tabelle bei den Kurven vom 28. 3. 59, 25. 4. und 26. 4. 59.

Tabelle 2

Datum	Netto-CO_2-Aufnahme in der					
	12,5 h-Lichtperiode			11,5 h-Dunkelperiode		
	Relativ p	mg CO_2/dm²	mg CO_2/g Trockengewicht	Relativ p	mg CO_2/dm²	mg CO_2/g Trockengewicht
28. 3. 59	*21,0*			*58,0*		
25. 4. 59	22,3	15,9	19,7	44,8	32,4	40,2
26. 4. 59	21,8	15,7	19,5	54,8	39,4	48,9

Jedenfalls zeigen die mitgeteilten Zahlen, daß in der Regel die nächtliche CO_2-Aufnahme so bedeutend ist, daß die Bildung von Malat aus vorher vorhanden gewesenen Hexosen unmöglich den CO_2-Stoffwechsel von Succulenten allein zu erklären vermag.

Zum Vergleich mit der CO_2-Stoffwechselbilanz der im normalen 24 h-Licht/Dunkelwechsel gehaltenen Bryophyllen folgen nunmehr die entsprechenden Zahlenwerte für die „36 h-Bryophyllen" (S. 43, 46).

Kurven vom 25. 4—29. 4. und 12.—15. 5. 58. Drei kleine 36 h-Bryophyllen, 30000 lx, 20 : 16 h Licht/Dunkelwechsel 400 l/h Luftdurchsatz. Temperaturen zwischen 15° C (Dunkelperiode) und 24° C (Lichtperiode) schwankend.

Wie man sieht, übertrifft bei diesen 36 h-Bryophyllen die CO_2-Aufnahme am Tage (362,1 p) bedeutend diejenige bei Nacht (65,8 p), d. h.

Tabelle 3

Datum	Licht		Dunkel	
	CO_2-Aufnahme	CO_2-Abgabe	CO_2-Aufnahme	CO_2-Abgabe
23. 4. 58	46,4 (T)		*9,4* (N)	2,1
25. 4. 58	36,4 (N)	0,4	8,5 (T)	8,3
26. 4. 58	50,3 (T)		*23,2* (N)	2,0
28. 4. 58	47,5 (N)		5,8 (T)	8,2
29. 4. 58	48,5 (T)		*21,0* (N) : nur 9 h lang	
12./13. 5. 58	61,4 (N)		12,0 (T)	10,0
14. 5. 58	72,0 (T)		21,5 (N)	5,0
	+362,5	0,4	+101,4	35,6
	− 0,4		− 35,6	
	+362,1 p		+ 65,8 p	

die 36 h-Pflanzen haben mehr oder weniger einen „normalen" CO_2-Stoffwechsel. Trotzdem ist aber analog zu dem auf S. 43 beschriebenen Versuch auch hier ein versteckter endogener 24 h-Rhythmus zu beobachten. Die Angaben (N) und (T) bedeuten nämlich, daß die Lichtperiode während des 20:16 h-Licht/Dunkelwechsels bald in die natürliche Licht- und bald in die natürliche Dunkelperiode fällt. Nun verläuft ja der normale Stoffwechsel eines 24 h-*Bryophyllums* aus dem Gewächshaus z. B. nach den Daten von S. 55, 56 so, daß hauptsächlich CO_2 während der Nacht, nicht aber am Tage aufgenommen wird. Folglich konnte man erwarten, daß, wenn die 16 h-Dunkelperiode in die natürliche Nacht fällt, auch die CO_2-Aufnahme eine größere ist, sofern eben der endogene 24 h-Rhythmus noch vorhanden ist. Dieses ist, wie die kursiv gedruckten Zahlen zeigen, tatsächlich der Fall, denn sie liegen alle höher als die entsprechenden Werte für eine in die natürlichen Tagesstunden fallende Dunkelperiode. Wir haben also auch hier ein schönes Beispiel dafür, daß sich der endogene 24 h-Rhythmus auf keine Weise ganz aus den Bryophyllen verbannen läßt, selbst wenn diese $1^1/_2$ Jahre lang in einem 36 h-Licht/Dunkelrhythmus aufgezogen worden sind.

VIII. Die CO_2-Aufnahme und -Abgabe von Bryophyllen, wenn sich diese periodisch in CO_2-freier Luft befinden

Für meine Hypothese, daß für den CO_2-Stoffwechsel von Bryophyllen in erster Linie die in der Nacht aufgenommene Kohlensäure und ihre Umwandlung in Malat maßgebend ist, bilden Versuche mit CO_2-freier Luft eine wichtige Stütze. Wie ich früher (1955 b) erwähnt hatte, ist es technisch schwierig, völlige CO_2-Freiheit der Küvettenluft in einem offenen Zirkulationssystem zu erzielen. Nach zahlreichen Versuchen konnten die Küvetten aber so gut abgedichtet werden, daß der URAS bei lebhaftem Luftwechsel durch die Küvetten nach 1—2 h (bei großem Küvetteninhalt) auf 0 zurückging. Die Versuchsmethodik wurde nun so

eingerichtet, daß mit der Schaltuhr, welche den Licht/Dunkelwechsel steuerte, ein elektrisches Gasventil verbunden wurde, so daß nach Belieben entweder Licht + CO_2 oder Dunkelheit + CO_2 oder Licht ohne CO_2 oder Dunkelheit ohne CO_2 geboten werden konnte. Stickstoff aus der Bombe statt CO_2-freier Luft zu bieten, war nicht möglich, denn bei O_2-Mangel verschlechterte sich der Allgemeinzustand der Bryophyllen sofort außerordentlich (vgl. Ranson-Thomas l. c., S. 90).

Nach meiner Hypothese muß es nun den Bryophyllen mehr oder weniger gleichgültig sein, wenn sie während der Lichtperiode kein CO_2 erhalten, wohl aber ist die Darbietung von CO_2 in der Dunkelperiode wichtig. Die Kurven bestätigten diese Anschauung und widerlegten gleichzeitig die Meinung, für die Bildung von Malat sei am Tage zuvor eine Photosynthese erforderlich.

Allgemeiner Verlauf der Kurven unter periodischer Darbietung von CO_2-freier Luft

(Kurven vom 18. 6.—6. 7. 59.) 25000 lx, Licht/Dunkelwechsel 14:10 h, 25° C. Luftdurchsatz 1 l/min.

1. Modalität (Abb. 17, 18). Licht + Normalluft; Dunkelheit + CO_2-freie Luft. Der Kurvenverlauf während der Lichtperiode ist praktisch nicht von dem unter normalen Verhältnissen zu unterscheiden. Während der Dunkelperiode mit CO_2-freier Luft geht jedoch der Schreiber des URAS nicht auf 0, sondern zeigt einen gewissen CO_2-Gehalt an, der auf Abgabe von CO_2 durch Atmung der Versuchspflanze zurückzuführen ist. Diese bewegt sich für mehrere, derartige CO_2-freie Dunkelperioden bei etwa 2,06—2,9 mg CO_2/h · dm^2 = 1,99—2,82 mg CO_2/h · g Trockengewicht. Im Verlauf *einer* Dunkelperiode, d. h. bis zum Beginn der nächsten Lichtperiode verläuft die CO_2-Abgabe sehr konstant. Der konstante Zustand der CO_2-Abgabe wird etwa 2 h nach Umschaltung auf CO_2-freie Luft erreicht.

Für den Verlauf der Lichtperiode mit Normalluft sei die Kurve vom 20. 6. 59 als repräsentativ beschrieben: Sowie das Licht um 8 h angeht und Normalluft eintritt, geht die CO_2-Kurve stark nach rechts und erreicht nach etwa $2^1/_2$ h den K.P. Der Kurvenverlauf während dieser Zeit weist aber darauf hin, daß an sich der endogene Rhythmus latent während der CO_2-freien Dunkelperiode weitergegangen ist. Daher findet man um 12 h 15′ — wie üblich — während der Photoperiode eine geringe CO_2-Abgabe (2,22 mg CO_2/h · dm^2) und darauf bis Ende der Lichtperiode einen schwachen Anstieg der Kurve, der am Schluß bei Beginn der Dunkelheit zu einer CO_2-Aufnahme von 3,8 mg/h · dm^2 führt. Am folgenden Tage (21. 6.) dauerte die CO_2-Abgabe während der Photoperiode + Normalluft länger und war stärker (bis zu 3,07 mg/h · dm^2). Sonst war kein Unterschied im Verhalten des Versuchsobjektes zu

beobachten. Am 22. 6. und 23. 6. war während der Lichtperiode + Normalluft sogar nur CO_2-Abgabe festzustellen (3,9 mg/h · dm²).

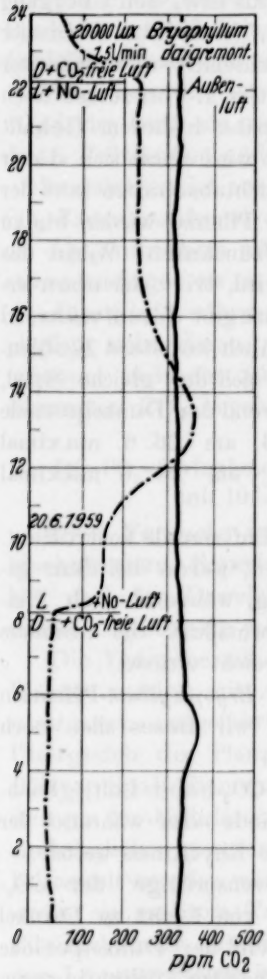


Abb. 17

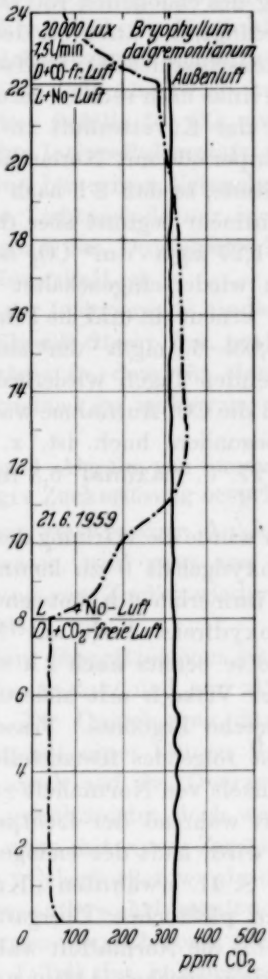


Abb. 18

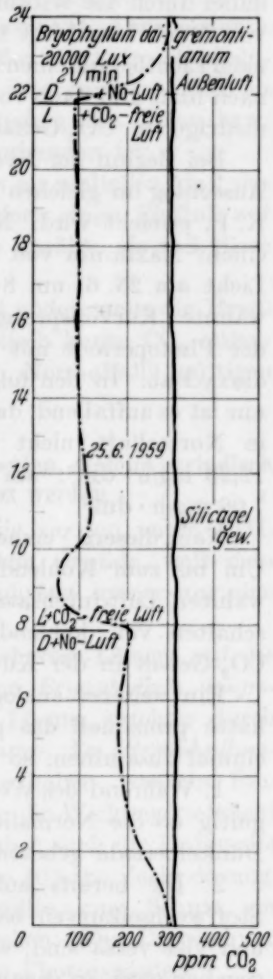


Abb. 19

Abb. 17. CO_2-Stoffwechselkurve von *Bryophyllum daigremontianum* bei CO_2-freier Luft während der Dunkelperiode, früherer Zustand. Ordinate = Uhrzeit

Abb. 18. CO_2-Stoffwechselkurve von *Bryophyllum daigremontianum* bei CO_2-freier Luft während der Dunkelperiode, späterer Zustand. Ordinate = Uhrzeit

Abb. 19. CO_2-Stoffwechselkurve von *Bryophyllum daigremontianum* bei CO_2-freier Luft während der Lichtperiode. Ordinate = Uhrzeit

2. *Modalität* (Abb. 19). Am 24. 6. wurde während der Lichtperiode CO_2-freie Luft und während der Dunkelperiode Normalluft gegeben. In diesem Falle findet während der Photoperiode nur Atmung statt,

die mit 3,79—9,11 mg CO_2/h · dm² erheblich höher als die CO_2-Abgabe in CO_2-freier Dunkelperiode liegt. Der höchste Wert von 9,11 mg ist dabei durch die Wirkung des endogenen Rhythmus bzw. den Übergang von Dunkel zu Licht bedingt, der auch bei der „Normalkurve" immer nach Lichtbeginn einen Ausschlag der CO_2-Stoffwechselkurve zuerst weiter nach links und dann von links nach rechts erzeugt, d. h. von zuerst noch niedrigerem CO_2-Gehalt der Küvettenluft zu später höherem Gehalt.

Bei Beginn der Nyctoperiode mit Normalluft wiederholt sich dieser Ausschlag im gleichen Sinne, so daß 2 h nach Lichtabschalten fast der K. P. erreicht wird. Nunmehr beginnt aber die Pflanze wieder bis zu einem Maximum von 11,27 mg/h · dm² CO_2 aufzunehmen Wenn das Licht am 25. 6. um 8 h wieder eingeschaltet wird, tritt der oben erwähnte „Kurvensprung" erneut ein und die Pflanze gibt darauf während der Photoperiode mit 5,03—6,0 mg/h · dm² ziemlich konstant Kohlendioxyd ab. In den folgenden Tagen wiederholt sich das gleiche Spiel, nur ist es auffallend, daß die CO_2-Aufnahme während der Dunkelperiode in Normalluft nicht besonders hoch ist, z. B. am 26. 6. maximal 12,23 mg/h · dm², am 27. 6. maximal 5,3 mg, am 28. 6. maximal 7,06 mg/h · dm².

Nach diesem Versuch wurde die Wirkung des Luftventils kontrolliert. Um bis zum Kohlendioxydgehalt 0 zu kommen, waren bei dem gewählten Luftdurchsatz immerhin 4 h notwendig, während nach Umschalten von kohlendioxydfreier Luft auf Normalluft der normale CO_2-Gehalt in der Küvette bereits nach 2 h erreicht wurde.

Ein weiterer analoger Versuch mit anderen *Bryophyllum*-Pflanzen hatte prinzipiell das gleiche Ergebnis. Fassen wir dieses alles noch einmal zusammen, so ist folgendes festzustellen:

1. Während des Wechsels von Normalluft zu CO_2-freier Luft, gleichgültig ob die Normalluft während der Lichtperiode oder während der Dunkelperiode geboten wird, läuft der endogene Rhythmus weiter.

2. Die bereits auf S. 41 erwähnten „Kurvensprünge" der CO_2-Stoffwechselkurven beim plötzlichen Übergang von Licht zu Dunkel und vice versa sind, wenn die Normalluft während der Dunkelperiode gegeben wird, in genau dem gleichen Ablauf vorhanden. Wird dagegen die Normalluft während der Photoperiode gegeben, so sind sie mehr oder weniger stark unterdrückt.

3. Nach dem auf S. 41 ff. Gesagten ist für diese Kurvensprünge und den Ablauf des endogenen Rhythmus nur die Deutung möglich, daß es sich um Veränderungen der Plasmapermeabilität für CO_2 handelt.

Diese Änderungen können aber weniger gut sichtbar werden, wenn die Bryophyllen allein in der Photoperiode CO_2-haltige Luft erhalten, weil sie das CO_2 dann auf Grund ihres spezifischen CO_2-Stoffwechsels nicht recht aufnehmen können. Die CO_2-Tension in den Geweben dürfte

daher in diesem Falle nur gering sein, so daß kein CO_2 für die Kurvensprünge oder „gushes and bursts" der Literatur zur Verfügung steht.

4. Die CO_2-freie Luft macht sich sowohl bei Licht als auch im Dunkeln dadurch bemerkbar, daß eine beträchtliche CO_2-Abgabe durch die Pflanzen eintritt, welche aber im Lichte größer ist als im Dunkeln.

Möglicherweise ist diese CO_2-Abgabe so zu interpretieren, daß in CO_2-freier Luft ein starkes Gefälle für CO_2 zwischen den Zellen bzw. deren Zellwänden und der Intercellularenluft vorhanden ist.

Im übrigen ist aus den bisherigen Versuchen zu schließen, daß der CO_2-Entzug während der Lichtperiode nur insofern einen Einfluß auf die CO_2-Aufnahme während der Dunkelperiode ausübt, als daß diese etwas niedriger als im Normalfall ist.

Normalluft während der Lichtperiode hindert andererseits die Bryophyllen nicht daran, während dieser Zeit praktisch kaum CO_2 aufzunehmen, vielmehr meistens in dem für den „Normalfall" gültigen schwachen CO_2-Abgabezustand zu verharren.

IX. Die CO_2-Aufnahme und -Abgabe von Succulenten, welche periodisch mit 10%iger Zuckerlösung bespritzt werden

Diese Versuche zeigen eine gewisse Analogie zu den unter VIII. beschriebenen Experimenten, und zwar aus dem Grunde, weil man hier nach der Darreichung von Zucker wiederum fast immer nur eine starke CO_2-Abgabe erhält.

Die Versuche mit dem Bespritzen von Saccharose-Lösung auf die Blätter wurden mit *Aloe aristata* und vor allem *Bryophyllum daigremontianum* ausgeführt. Die Darreichung der Lösung erfolgte durch Übergießen der Planzen mit einer kleinen Brause. Da *Bryophyllum*-Blätter Spaltöffnungen auch auf der Oberseite haben, war ein Eindringen der Nährlösung gewährleistet, doch wäre die Wirkung vielleicht eindringlicher gewesen, wenn mit einem Zerstäuber auch die Unterseite behandelt worden wäre. Gelegentlich wurde die 10%ige Zuckerlösung, wenn sie mehrere Tage aufbewahrt werden sollte, zum Schutz vor Pilzinfektionen mit Spuren von Chinosol versehen. Die Darreichung der Lösung erfolgte im 1. Teil der 14-stündigen Photoperiode.

Ganz allgemein tritt kürzere oder längere Zeit nach dem Geben der Zuckerlösung eine starke CO_2-Abgabe (Atmung) auf, die teilweise beträchtlich stärker als die vorhergehende CO_2-Aufnahme ausfällt. Bei *Aloe* ist diese Atmung gewöhnlich intensiver als bei *Bryophyllum*, was vielleicht damit zusammenhängt, daß sich die Lösung zwischen den gestaucht angeordneten Blättern länger hält, während sie bei den *Bryophyllum*-Blättern schnell abtropft. Nach und nach klingt die Zuckerwirkung ab, was sich bei *Bryophyllum* durch Abnahme der CO_2-Abgabe ausdrückt. Man kann dann besonders deutlich sehen, daß

der endogene Plasmarhythmus weiter — auch im Atmungsbereich — anhält, denn wenn das Licht an- und abgeschaltet wird, treten die auf S. 41 erwähnten Kurvensprünge auf.

Vielfach verlaufen die Kurven der mit Zuckerlösung bespritzten Pflanzen völlig parallel zu den Kurven der nicht behandelten Pflanzen, nur sind sie unter die Kompensationslinie (= Kurve für den CO_2-Gehalt der Außenluft) nach der Atmungsseite zu verschoben. Hält man die Pflanzen im Dauerdunkel, so ist die CO_2-Abgabe entsprechend stärker als bei beleuchteten Pflanzen.

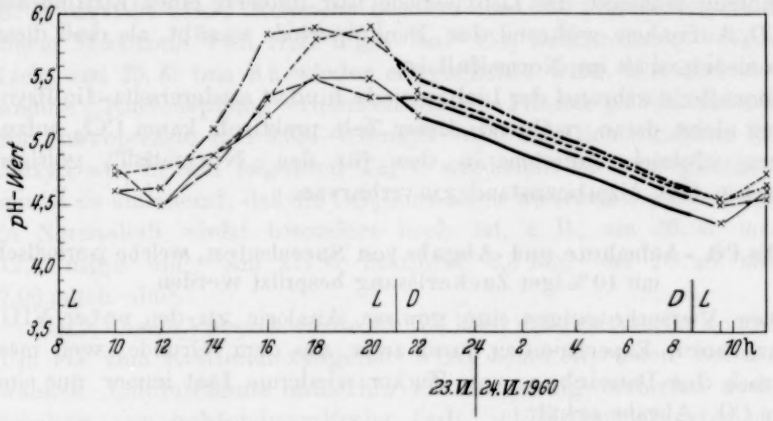


Abb. 20. Verlauf des pH-Wertes des Zellsaftes von *Bryophyllum daigremontianum* mit (– – – – –; – · – · –) und ohne (———; — — —) Zuckerfütterung der Blätter

Bei manchen Pflanzen dauert es länger, bei anderen kürzer, bis die Zuckerwirkung auf den CO_2-Stoffwechsel einsetzt. Im günstigsten Fall geht das Versuchsobjekt fast sofort nach Darreichen der Zuckerlösung zur CO_2-Abgabe über, im ungünstigsten Fall vergehen bis zu diesem Stadium über 24 h. Ebenso ist auch die Dauer der Zuckerwirkung unterschiedlich. So ging ein vorher im Gewächshaus befindliches *Bryophyllum daigremontianum*, das in der Küvette vom 26. 2.—6. 3. 59 bei einem Luftdurchsatz von 240 l/h, 14:10 h Licht/Dunkelwechsel, und 25000 lx nur schwachen CO_2-Stoffwechsel mit De Saussure-Effekt (nächtliche CO_2-Aufnahme) zeigte und am 5. 3. 59 Zucker bekam, vom 6. 3. 59 10 h an zu starker CO_2-Abgabe über. Diese dauerte trotz des Licht/Dunkelwechsels noch bis zum 9. 3. 59 an.

Auch bei *Aloe* trat häufiger der Fall ein (Kurve vom 10. 1. 59), daß die CO_2-Abgabe mit ihrem Maximum erst etwa 24 h nach dem Begießen mit der Zuckerlösung einsetzte, und dann tagelang (hier bis zum 15. 1.) anhielt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die verspätete Reaktion der Pflanzen auf das Bespritzen mit Zucker durch das unkontrollierbare verzögerte Eindringen des Kohlenhydrates in die Zellen bedingt ist.

Was mit dem Zucker in der Pflanze geschieht, kann nicht ohne weiteres gesagt werden. Daß er von etwa in den Intercellularen der Blätter vorhandenen Mikroorganismen oxydiert wird, ist unwahrscheinlich, denn dann würde sich bei der CO_2-Abgabe wohl nicht der endogene Rhythmus so deutlich bemerkbar machen. Ich habe den p_H-Wert von mit Zucker bespritzten und unbespritzten Bryophyllen über 24 h lang verfolgt, wobei die Acidität des Zellsaftes der gespritzten Blätter deutlich niedriger lag (Abb. 20). Hieraus ist zu schließen, daß ein Einbau des Kohlenhydrates in Malat — wenn überhaupt — nur unvollkommen erfolgt. Die Malatsynthese scheint aber trotz der Zuckergabe, wenn auch mit verringerter Intensität vor sich zu gehen, denn sonst wäre der auch jetzt vorhandene diurnale Aciditätswechsel nicht zu verstehen. Wahrscheinlich wird der Großteil des Zuckers unabhängig vom Malat-Speicherungssystem nach dem Schema des normalen Atmungsstoffwechsels über den Tricarbonsäurecyclus zu CO_2 abgebaut.

Meyer-Mevius (1959, S. 588) fütterte *Tropaeolum*-Blätter ebenfalls mit Saccharose, aber auch mit anderen Hexosen. Sie maß den O_2-Verbrauch in der Warburg-Apparatur und stellte bei Darreichung von Saccharose eine bedeutend höhere Atmung als bei Fütterung mit z. B. Lactose und Rhamnose fest. Der Wert des Respirationsquotienten habe bei den mit Rohrzucker gefütterten Proben nahe 1 gelegen. In unserem Fall hätte man den Respirationsquotienten genau nur mit einer gleichzeitig mit den URAS-Messungen stattfindenden Gasanalyse des Sauerstoffverbrauchs bestimmen können. Hierfür standen aber keine Apparaturen zur Verfügung.

X. Über die Natur des für die CO_2-Fixierung bei den Succulenten erforderlichen Reaktionssystems

Wie schon in Abschnitt II betont (S. 30), ist für das Zustandekommen der nächtlichen CO_2-Fixierung bei den Pflanzen mit diurnalem Säurerhythmus 1. genügend starke Beleuchtung in der der Dunkelperiode vorangegangenen Lichtperiode, 2. das Vorhandensein eines lichtempfindlichen enzymatischen Reaktionssystems erforderlich. Vor allem in meiner Arbeit von 1957 (S. 205ff.) suchte ich diese beiden Punkte an der Hand von Literaturangaben zu analysieren. Die Notwendigkeit der Beleuchtung für das Zustandekommen der CO_2-Fixierung im Dunkeln ist vielleicht das interessanteste Problem der Art und Weise, wie die Succulenten ihre Photosynthese ausführen, denn dieser Prozeß ist bei ihnen schon von Natur aus in mindestens zwei Teilvorgängen zerlegt, den wir bei den Pflanzen mit „normaler" Photosynthese erst künstlich konstruieren müssen, nämlich 1. die Aufnahme von Lichtenergie und 2. der nach diesem photochemischen Prozeß rein chemisch im Dunkeln ablaufende Vorgang der CO_2-Fixierung und deren

Einbau in organische Substanz. Ich möchte annehmen, daß sich an diesen 2. Prozeß ein 3. lichtabhängiger Vorgang anschließt, in dem die von der aufgenommenen CO_2 herrührende Äpfelsäure unter Abgabe dieser CO_2 wieder in ihre Ausgangsverbindung überführt wird, während das CO_2 in normaler Weise photosynthetisch zu Kohlenhydrat umgewandelt wird.

Im folgenden seien mangels eigener experimenteller Befunde an Hand der neuen Literatur die Modalitäten diskutiert, die maßgebend für die Dunkelfixierung der CO_2 nach vorheriger Beleuchtung und den nachfolgenden Abbau der CO_2 sind.

1957 (S. 207ff.) nahm ich vielleicht zu sehr vereinfacht an, der Hauptvorgang der Dunkelfixierung der CO_2 liege nach einem Befund von OCHOA (1951) in der reduktiven Karboxylierung von Brenztraubensäure zu l-Äpfelsäure unter Aufnahme von CO_2 mittels des hydrierten Coenzyms TPNH + H^+. PIRSON (1957) hielt diese Annahme für bisher unbewiesen.

$$\begin{array}{l}\mathrm{CH_3}\\ |\\ \mathrm{CO}\\ |\\ \mathrm{COOH}\end{array} + \mathrm{CO_2} + \mathrm{TPNH} + \mathrm{H^+} \rightleftharpoons \begin{array}{l}\mathrm{COOH}\\ |\\ \mathrm{CH_2}\\ |\\ \mathrm{CHOH}\\ |\\ \mathrm{COOH}\end{array} + \mathrm{TPN^+}\ \text{(Malic Enzym)}$$

Trotzdem dürfte das Prinzip dieser Hypothese nach wie vor zutreffen, nur sind mehrere enzymatische Reaktionen an dem Prozeß beteiligt, von denen aber eine sicherlich in der Reduktion von Pyridin-Nucleotiden durch das Licht besteht.

$$\mathrm{H_2O} + \left\{\begin{array}{l}\mathrm{TPN^+}\\ \mathrm{DPN^+}\end{array}\right. \xrightarrow[\text{Chloroplasten}]{\text{Licht}} \left\{\begin{array}{l}\mathrm{TPNH + H}\\ \mathrm{DPNH + H}\end{array}\right. + {}^1/_2\,\mathrm{O_2}.$$

1958 ist außerdem von ARNON et al. (s. die Übersicht von KANDLER 1960) entdeckt worden, daß Lichtenergie mit Hilfe von gebrochenen Chloroplasten (d. h. Chloroplasten-Suspension in Wasser) und Chloroplastenextrakt gleichzeitig neben der Pyridinnucleotid-Reduktion auch aus ADP + anorganischem Phosphat ATP zu bilden vermag nach der Formel:

$$\mathrm{TPN + ADP + P_i + Licht} \xrightarrow[\mathrm{Mg^{++}},\ \text{Chloroplastenextrakt}]{\text{gebrochene Chloroplasten}} \mathrm{TPNH + ATP + {}^1/_2\,O_2}.$$

Das Vorhandensein von ATP ist aber wichtig für die Bildung von Ribulose-Diphosphat aus Ribulose-5-Phosphat (s. S. 66).

Im übrigen wird jetzt von vielen Autoren (s. z. B. DUYSENS-AMESZ 1959, BUTLER 1960, KANDLER l. c., S. 51) TPNH neben ATP als absolut notwendig für die CO_2-Reduktion über PGA bei der Photosynthese angesehen.

EBERHARDT (1958, S. 180) zählt in seiner Zusammenfassung 3 verschiedene Möglichkeiten der CO_2-Dunkelfixierung auf, die alle eine

Variante der auch von mir (1957, S. 208) in Erwägung gezogenen Wood-Werkman-Reaktion sind, nämlich:

1. Mittels Äpfelsäureenzym (malic enzyme) die oben erwähnte reduktive Karboxylierung der Brenztraubensäure, wobei nach ihm nur statt TPN das Coenzym DPN als Wasserstoffüberträger dient.

$$CH_3 \cdot CO \cdot COOH + CO_2 + DPN{-}H_2 \rightleftharpoons HOOC \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot COOH + DPN$$

2. Mittels Phospho-enol-Brenztraubensäure, Carboxykinase und ADP die Umwandlung des PEP zu Oxalessigsäure:

$$CH_2 = \underset{\displaystyle O \sim PO_3H_2}{\overset{|}{C}}{-}COOH + CO_2 + ADP \rightleftharpoons HOOC \cdot CH_2 \cdot CO \cdot COOH + ATP$$

Diese Reaktion hat aber nach Ranson-Thomas (l. c., S. 97) weniger Wahrscheinlichkeit, weil man PEP-Carboxykinase, obwohl an sich weit verbreitet in Pflanzengeweben, bisher noch nicht in Pflanzen mit CAM nachgewiesen hat.

3. Die gleiche Reaktion wie unter 2., jedoch ohne ADP mit Hilfe von PEP-Carboxylase:

$$CH_2 = \underset{\displaystyle O \sim PO_3H_2}{\overset{|}{C}}{-}COOH + CO_2 \rightleftharpoons HOOC \cdot CH_2 \cdot CO \cdot COOH + P_i$$

Die 3. Reaktion halten Eberhardt und Ranson-Thomas (1960, S. 98) für am wahrscheinlichsten, weil man im Blattextrakt von *Bryophyllum* PEP-Carboxylase und außerdem als erstes Produkt der Dunkelfixierung von CO_2 Oxalessigsäure hat nachweisen können.

Die Reduktion der Oxalessigsäure zu Äpfelsäure erfolgt dann weiter durch Äpfelsäuredehydrogenase und DPN-H_2. Dieses DPN-H_2 müßte dann aber nach meiner Hypothese während der Lichtperiode aus DPN reduziert werden, so daß also auch hier die Mitwirkung des Pyridinnucleotids erforderlich ist.

Gegen die unter 3. beschriebene Hypothese spricht nur die von mir 1957 zitierte Feststellung Ochoas, daß in der Regel die Koppelung der beiden Reaktionen Brenztraubensäure-Oxalessigsäure und Oxalessigsäure-l-Äpfelsäure in vitro nicht gelingt.

Wichtig ist bei der Beurteilung der Versuchsergebnisse verschiedener Autoren die Vorbehandlung ihres Versuchsmaterials. Zum Beispiel benutzten Saltman-Kunitake-Spolter-Stitts (1956) nur junge Blätter von 1—2 cm Länge von *Bryophyllum calycinum* für ihre Versuche. Nun sind nach dem auf S. 42 Gesagten vor allem nur die älteren, ausgewachsenen Blätter an dem diurnalen Säurerhythmus beteiligt, nicht aber die jungen, noch unausgewachsenen. Außerdem konnten die abgeschnittenen Blätter nur 20 min lang im Dunkeln CO_2 fixieren.

Wenn nun SALTMAN et al. als erstes Produkt der CO_2-Fixierung die Oxalessigsäure postulieren nach dem Schema:

$$\text{Kohlenhydrat} \overset{\text{Glykolyse}}{\rightleftharpoons} \text{PEP}$$

$$\text{PEP} \xrightarrow[\text{PEP-Carboxylase}]{+CO_2} \text{Oxalessigsäure}$$

so mag die Art der Bildung des PEP vielleicht für ihre Versuche zutreffen, dürfte sich aber nicht unbedingt auf den allgemeinen Fall der CO_2-Speicherung im diurnalen CO_2-Stoffwechselrhythmus erstrecken.

RANSON-THOMAS (1960, S. 102) stellen auch die Möglichkeit in Betracht, daß Ribulose-Diphosphat *und* PEP als CO_2-Akzeptoren fungieren:

$$\text{RDP} + CO_2 \longrightarrow 2\ \text{PGA}$$
$$2\ \text{PGA} - 2\ H_2O \longrightarrow 2\ \text{PEP}$$

Allerdings können sie sich nicht erklären, wie im Dunkeln RDP gebildet wird. Da nun aber nach ARNON et al. (s. S. 64) ATP mit Hilfe von Lichtenergie aus $ADP + P_i$ gebildet und andererseits nach dem Calvin-Schema der Photosynthese RDP mit Hilfe von ATP und-Kinase aus Ribulose-5-Phosphat entsteht (vgl. LEUTHARDT 1959, S. 527), hat dieser Weg der Malatsynthese Wahrscheinlichkeit gewonnen. Hierbei könnte sogar in doppelter Weise CO_2 fixiert werden, einmal mit Hilfe von RDP, das andere Mal bei der Umsetzung von PEP zu Oxalessigsäure. Eine *Dunkel*-CO_2-Fixierung über RDP mittels ATP würde indessen nicht die so charakteristische Vergrößerung des Malatgehaltes während der Dunkelperiode verursachen können.

Vielleicht hat aber die CO_2-Fixierung mittels RDP größere Bedeutung für die Umsetzung des in der Nacht gebildeten Malats in Kohlenhydrate. Dieses kann nur bei Licht geschehen, denn sonst würde bereits im Dunkeln die Malatmenge abnehmen. Außerdem stellte schon VICKERY (1954) fest, daß Stärke im Dunkeln höchstens verschwindet, nicht aber gebildet wird, was nur im Licht geschieht (VICKERY 1959).

Nach RANSON-THOMAS (l. c., S. 104) wird zunächst die Äpfelsäure wieder decarboxyliert und ergibt dabei CO_2 und Pyruvat oder PEP sowie DPNH. Sie erörtern die Frage, was mit dem Pyruvat oder PEP geschieht. Es wird angenommen, daß nur wenig Pyruvat oder PEP, z. B. über PGA auf dem umgekehrten Weg der Glykolyse direkt zu Kohlenhydraten synthetisiert wird. Der Hauptteil soll über den Tricarbonsäure-Cyclus zu CO_2 oxydiert werden.

Meines Erachtens wird aber diese Anschauung dem Problem der Kohlenstoffgewinnung bei den Succulenten nicht gerecht. Es ist nicht einzusehen, warum das in der Nacht gebildete Malat erst am folgenden Tag über den Tricarbonsäurecyclus wieder vollständig zu CO_2 abgebaut werden muß. Einen wirklichen Kohlenstoffgewinn hat die Pflanze doch nur von dem CO_2, das bei der Decarboxylierung des Malats anfällt. Das PEP braucht sie aber wieder für die Malatbildung in der folgenden

Dunkelperiode, denn sonst müßte dieses aus Kohlenhydraten neu gebildet werden[1]. Ich glaube daher, daß in der Hauptsache das PEP unangetastet bleibt und nur das bei seiner Bildung anfallende CO_2 nach dem Calvin-Schema (BASSHAM-CALVIN 1960, S. 915) durch RDP zu PGA umgesetzt wird. Die hierfür notwendige Lichtenergie ist bei der für die RDP-Bildung notwendigen Umsetzung von ADP zu ATP verbraucht worden. Das bei der Decarboxylierung der Äpfelsäure wieder reduzierte Pyridinnucleotid könnte entweder mit ATP zur Überführung der PGA in Phosphoaldo bzw. -ketotriose gebraucht werden, oder es dient in der folgenden Dunkelperiode erneut zur Umsetzung von PEP bzw. Oxalessigsäure in Malat. In diesem Falle würde allerdings die Abhängigkeit der Malatbildung von der zuvor gegebenen Lichtmenge schwieriger zu deuten sein. Jedenfalls bedeutet die Kohlenhydratbildung über PGA den endgültigen Kohlenstoffgewinn.

Mit dieser Hypothese dürfte man wohl am ehesten erklären, warum bei Pflanzen wie *Kalanchoe*, dünne Blätter direkt die CO_2 assimilatorisch verwerten können und nur dicke Blätter den Umweg über die Malatbildung beschreiten, oder wenn bei 36 h-Bryophyllen eine Photosynthese ohne nächtliche Speicherung erfolgt. Das hängt davon ab, ob die CO_2 tagsüber Zugang zu den Chloroplasten hat. Ist dieser beschränkt bzw. wird kein CO_2 aufgenommen, so muß die Lichtenergie über Tag und das CO_2 über Nacht gespeichert werden. Ist aber das CO_2 einmal im Malat inkorporiert, so steht es in der folgenden Lichtperiode für die Photosynthese zur Verfügung, und es macht nichts aus, wenn von außen her kein CO_2 aufgenommen werden kann. Im übrigen ergibt sich hieraus, wie wichtig für das Zustandekommen des CAM eine in Licht und Dunkelheit wechselnde Eintrittsmöglichkeit für das CO_2 in die assimilierenden Zellen bzw. die Einflüsse des endogenen Rhythmus sind.

Zusammenfassung

1. Das Vorkommen des „De Saussure-Effektes" (nächtliche CO_2-Speicherung durch Malat) ist von 3 Bedingungen abhängig:

a) Dem Vorhandensein eines lichtempfindlichen enzymatischen, auf die Bildung und den Abbau von Äpfelsäure wirkenden Reaktionssystems;

b) einer genügenden Succulenz der assimilierenden Organe;

c) einer bei Licht und Dunkelheit wechselnden CO_2-Permeabilität des Zellgewebes für Kohlendioxyd.

Im übrigen lassen sich für das Vorkommen des De Saussure-Effektes bei den einzelnen Pflanzenfamilien keine bestimmten Regeln aufstellen,

[1] So konnten die Pflanzen in den auf S. 58 beschriebenen Versuchen mit CO_2-freier Luft auch bei CO_2-Entzug während der Lichtperiode in der folgenden Dunkelperiode CO_2 aufnehmen. Es mußte also genügend PEP trotz Unmöglichkeit einer direkten Photosynthese zur Verfügung gestanden haben.

jedoch führt ein diurnaler Wechsel eines etwaigen Gehaltes an Isocitronensäure meist zu keinem De Saussure-Effekt.

2. Die succulenten Blätter von Pflanzen mit und ohne De Saussure-Effekt weisen keine auffallenden anatomischen Unterschiede auf.

3. Der De Saussure-Effekt ist mit einem 24stündigen endogenen Rhythmus verknüpft, der in einer auch im Dauerlicht konstanter Intensität vorhandenen Änderung des CO_2-Stoffwechsels besteht.

4. Der De Saussure-Effekt hat bei *Bryophyllum daigremontianum* einen Jahresrhythmus, denn seine Umstellung auf andere Beleuchtungsrhythmen erfolgt nur im Sommer und Herbst schnell und vollständig. Im zeitigen Frühjahr geschieht sie träge und unvollständig.

5. Der endogene 24 h-Rhythmus ist noch bemerkbar, wenn sich *Bryophyllum* in einem 36 h-Licht/Dunkelrhythmus verschiedener Unterteilung (z. B. 20:16 h oder 9:9:9:9 h) befindet. Wahrscheinlich steht er unter dem Einfluß der Hochenergiereaktion des Rot/IR-Pigmentsystems. Im konstanten Dauerlicht der Natriumdampflampe läuft er monatelang weiter, klingt dagegen in starkem Fluorescenzlicht mit viel Blaustrahlung ab.

6. Der p_H-Wert des Zellsaftes von Succulenten mit De Saussure-Effekt verläuft über 24 Std mit dem CO_2-Stoffwechsel annähernd parallel. Bei Nichtvorhandensein von nächtlicher CO_2-Aufnahme sind die diurnalen Schwankungen des p_H-Wertes viel geringer.

7. Es werden weitere Versuche beschrieben, nach denen das Zustandekommen der generativen Phase bei photoperiodischen Gewächsen direkt *nichts* mit deren CO_2-Stoffwechsel zu tun hat.

8. Für die CO_2-Aufnahme der Blätter von *Bryophyllum daigremontianum* wurden im Normalfall Werte bis zu 5,66 mg $CO_2/h \cdot dm^2$ ermittelt. Unter bestimmten Umständen erfährt dieser Wert eine bedeutende Steigerung.

9. Der Netto-Betrag der CO_2-Aufnahme im Dunkeln ist normalerweise stets höher als der Betrag der CO_2-Aufnahme im Licht.

Häufig wird in der Dunkelperiode mehr als 2,5mal so viel CO_2 als im Lichte aufgenommen.

10. In CO_2-freier Luft befindliche Bryophyllen geben während der Lichtperiode mehr CO_2 als während der Dunkelperiode ab. Der endogene Rhythmus macht sich auch in CO_2-freier Luft bemerkbar. CO_2-Entzug während der Photoperiode verringert etwas die CO_2-Aufnahme während der Nyctoperiode.

11. Darreichung von Saccharose über die Blätter an *Aloe aristata* und *Bryophyllum daigremontianum* führt während längerer Zeit zu starker CO_2-Abgabe. Auch während dieser Zeit läßt sich das Weiterbestehen des endogenen Rhythmus nachweisen.

12. Der lichtabhängige Chemismus der CO_2-Fixierung wird diskutiert.

Meiner Assistentin Frl. GESA BOIT danke ich sehr für ihre Mitarbeit bei den Versuchen.

Literatur

BASSHAM, J. A., and M. CALVIN: The path of carbon in photosynthesis. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 5/1, S. 884–922. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

BENDRAT, M.: Ein Beitrag zur Kenntnis des Säurestoffwechsels sukkulenter Pflanzen. Planta (Berl.) **7**, 508–584 (1929).

BONDE, K. K.: The effect of various cycles of light and darkness on the growth of tomato and Cocklebur plants. Physiol. Plantarum (Cph.) 8, 913—923 (1955).

BORGSTRÖM, G. A.: The amount of citrate present in the leaves of some *Kleinia*-species. A new type of succulent plants. Kgl. fysiograf. Sällsk. Lund Förh. **4**, 142 (1934a).

— Further notes on the occurrence of citrate in succulent plants. Kgl. fysiograf. Sällsk. Lund Förh. **4**, 235—243 (1934b).

— Citrate in crassulacean leaves. Skand. Arch. Physiol. **80**, 52—58 (1938).

BOYSEN-JENSEN, P.: Die Stoffproduktion der Pflanzen. Jena 1932.

BÜNNING, E.: Endogenous rhythms in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **7**, 71—90 (1956a).

— Versuche zur Beeinflussung der endogenen Tagesrhythmik durch chemische Faktoren. Z. Bot. **44**, 515—529 (1956b).

— Mechanismus und Leistung der physiologischen Uhr. Nova Acta Leopoldina, N. F. **21**, Nr 143, 179—194 (1959).

—, u. G. JOERRENS: Tagesperiodische antagonistische Schwankungen der Blau-Violett-Gelbrot-Empfindlichkeit als Grundlage der photoperiodischen Diapause-Induktion bei Pieris brassicae. Z. Naturforsch. **15b**, 205—213 (1960).

—, u. L. LÖRCHER: Regulierung und Auslösung endogentagesperiodischer Blattbewegungen durch verschiedene Lichtqualitäten. Naturwissenschaften **44**, 472—473 (1957).

—, u. G. SCHÖNE-SCHNEIDERHÖHN: Die Bedeutung der Zellkerne im Mechanismus der endogenen Tagesrhythmik. Planta (Berl.) **48**, 459—467 (1957).

BUTLER, W. L.: A secondary photosynthetic carboxylation. Plant Physiol. **35**, 233—237 (1960).

DUYSENS, L. N. M., and G. AMESZ: Quantum requirement for phosphopyridine nucleotide reduction in photosynthesis. Plant Physiol. **34**, 210—213 (1959).

EBERHARDT, F.: Stoffwechsel organischer Verbindungen. II. Fortschr. Bot. **20**, 169—199 (1958).

FEINDT, F.: Untersuchungen über den Einfluß von Stickstoff- und Phosphor-Mangel auf die CO_2-Assimilation und Atmung bei Gurke und Tomate. Unveröffentl. Diplomarbeit. Hamburg 1960.

GOEBEL, K.: Die Entfaltungsbewegungen der Pflanzen und deren teleologische Deutung, 2. Aufl. Jena 1924.

HAMDORF, G.: Experimentelle Untersuchungen zur Erfassung der maximalen photosynthetischen Leistung bei Landpflanzen. Flora (Jena) **147**, 521—552 (1959).

HANSGIRG, A.: Beiträge zur Kenntnis über die Verbreitung der Reizbewegungen und der nyctitropischen Variationsbewegungen der Laubblätter. Ber. dtsch. bot. Ges. **8**, 355—364 (1890).

HILLMAN, W. S.: Injury of tomato plants by continuous light and unfavorable photoperiodic cycles. Amer. J. Bot. **43**, 89—96 (1956).

HONERT, T. H. VAN DEN: Carbon dioxide assimilation and limiting factors. Rec. Trav. bot. néerl. **27**, 149—286 (1930).

Kandler, O.: Energy transfer through phosphorylation mechanisms in photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. **11**, 37—54 (1960).

Leutharidt, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie, 14. Aufl. Berlin 1959.

Meyer-Mevius, U.: Vorkommen und Transport von Kohlenhydraten und Stickstoffverbindungen in den pflanzlichen Leitungsbahnen. Flora (Jena) **147**, 553—594 (1959).

Mohr, H.: Der Lichteinfluß auf das Wachstum der Keimblätter bei Sinapis alba L. Planta (Berl.) **53**, 219—245 (1959).

Nuernbergk, E. L.: Vergleichende Dauerregistrierung der Photosynthese gärtnerisch wichtiger Pflanzen mit dem Ultrarot-Absorptionsschreiber. Proc. Irst Intern. Photobiol. Congr. Amsterdam 1954, S. 352—356. 1954.

— Über den zeitlichen Verlauf der Photosynthesen bei Gewächshauspflanzen. Gartenbauwiss. **19**, 391—398 (1955a).

— Zur Technik der vergleichenden Messung der Photosynthese mittels des URAS und ihre Anwendung auf die Untersuchung periodischer Photosynthesekurven. Gartenbauwiss. **20**, 58—91 (1955b).

— Weitere Beiträge zum Kohlendioxyd-Stoffwechsel von Pflanzen mit diurnalem Säurerhythmus und von Lang- und Kurztagpflanzen. Mitt. Inst. allg. Bot. Hamburg **11**, 205—232 (1957).

Ochoa, S.: Biosynthesis of dicarboxylic and tricarboxylic Acids by Carbon dioxide Fixation. Symp. Soc. exp. Biol. **5**, 29—51 (1951).

Overbeck, G.: Zellphysiologische Studien an Bryophyllum in Zusammenhang mit dem täglichen Säurewechsel. Protoplasma **48**, 241—260 (1957).

Pirson, A.: Stoffwechsel organischer Verbindungen I (Photosynthese). Fortschr. Bot. **19**, 235—262 (1957).

Rabinowitch, E. I.: Photosynthesis II/1, 2. 1951—1956.

Ranson, S. L., and M. Thomas: Crassulacean acid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. **11**, 81—110 (1960).

Saltman, P., G. Kunitake, H. Spolter and Cl. Stitts: The dark fixation of CO_2 by succulent leaves: the first products. Plant. Physiol. **31**, 464—468 (1956).

Vickery, H. B.: The effect of abnormally prolonged alternating periods of light and darkness upon the composition of *Bryophyllum* leaves. Plant Physiol. **29**, 520—526 (1954).

— Effect of light upon the behavior of citric acid in leaves of *Bryophyllum calycinum* Salisb. Plant Physiol. **34**, 418—427 (1959).

Villwock, I.: Ökologisch-physiologische Untersuchungen zur Frage von Großstadteinflüssen auf die Verbreitung epiphytischer Flechten. Diss. Hamburg. 73 S. Manuskr. (1959).

Vries, H. de: Über die periodische Säurebildung der Fettpflanzen. Bot. Ztg **42**, 337—344, 353—358. Siehe auch Opera e priodicis collata **4**, 396—451 (1884).

Warburg, O.: Über die Bedeutung der organischen Säuren für den Lebensprozeß von Pflanzen (speziell der sog. Fettpflanzen). Unters. bot. Inst. Tübingen **2**, 53—150 (1886).

Wilkins, M. B.: An endogenous rhythm in the rate of carbon dioxide output of *Bryophyllum*. I. J. exp. Bot. **10**, 377—390 (1959). II. J. exp. Bot. **11**, 269—288 (1960).

Prof. Dr. E. L. Nuernbergk,
Staatsinstitut für Allgem. Botanik, Hamburg 36, Jungiusstr. 6—8

Planta 56, 71–96 (1961)

Aus dem Institut für angewandte Botanik der Universität Tübingen

DIE ENTWICKLUNG DES LEITBÜNDELSYSTEMS IM KEIMBLATT VON *PULSATILLA VULGARIS* MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER PROTOXYLEM-DIFFERENZIERUNG*

Von

HANS-ROLF HÖSTER und WALTER ZIMMERMANN

Mit 19 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. September 1960)

A. Einleitung

Im Vergleich zu den Laubblättern sind die Kotyledonen nach v. GUTTENBERG (1960) bisher nur wenig ontogenetisch untersucht worden. Die Keimblätter sind zwar offensichtlich den Laubblättern homolog, trotzdem zeigt ihre Ontogenie Unterschiede. Diese ergeben sich aus der vollkommen andersartigen Entstehung jener Blattgebilde. Das Übersehen dieser Tatsache ist vielleicht Schuld an manchen Diskussionen über die Histogenese.

Aus diesem Grund erschien es wesentlich, vor allem die besonderen Verhältnisse in der Ontogenie der primären Keimblattbündel zu untersuchen. In den letzten beiden Jahrzehnten hat die Differenzierung der primären Bündelgewebe eine große Bedeutung erlangt. Im Vordergrund stand dabei die Entscheidung, ob die Differenzierung acropetal oder basipetal erfolgt.

Das Muster der Bündeldifferenzierung wurde in den älteren Arbeiten vielfach auf der Grundlage der Entwicklung des Protoxylems interpretiert. Neuere Untersuchungen haben aber ergeben, daß die Richtung der Procambium-Differenzierung nicht notwendigerweise mit der des Protoxylems oder Protophloëms übereinstimmen muß. Bei der Differenzierung der primären Bündelgewebe handelt es sich um mehrphasige Prozesse, deren Differentiatoren sehr wohl voneinander verschieden sein können. Für die Differenzierung des Protoxylems ist ein Faktor bereits in der β-Indolylessigsäure gefunden worden (JACOBS und MORROW 1957).

Bei den Angiospermen stellt die acropetale Differenzierung des Procambiums die Regel dar (ESAU 1943, 1954, DE SLOOVER 1958). Einige Monokotylen machen dabei anscheinend eine Ausnahme: die Mediane und die Hauptlateralen entwickeln sich zwar acropetal, nach Erreichen

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. HERMANN VON GUTTENBERG zum 80. Geburtstag gewidmet.

Als Dissertation von HÖSTER bei der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen eingereicht.

der Blattspitze biegt aber ein Teil dieser Lateralen um, und das Procambium differenziert sich zur Basis hin.

Das steht nun keineswegs im Widerspruch zur allgemeinen Auffassung. Es ist nämlich grundsätzlich zu unterscheiden, ob sich acropetal bzw. basipetal auf die Ausgliederung des Procambiumstranges oder auf die Gesamtmorphologie des Blattes bezieht. Selbst wenn ein solcher Procambiumstrang umbiegt und sich dann basipetal in Richtung auf den Blattstiel entwickelt, so ist seine Differenzierung natürlich immer noch acropetal in bezug auf das Leitbündelsystem. Dieser Unterschied ist häufig nicht beachtet worden.

Mit der Differenzierung der primären Leitbündelgewebe ist die Ontogenie des Adernetzes eng verbunden. Die heutige Nervaturforschung wendet sich vor allem der Kleinaderung zu (FOSTER 1952, PRAY 1960, SLADE 1959). Im Zusammenhang mit der Ausbildung des Adernetzmusters ergab sich die Frage, ob und inwieweit die frühen Stadien der Entwicklung Merkmale der von der *Telomtheorie* angenommenen phylogenetischen Ahnen rekapitulieren.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an Keimblättern von *Pulsatilla vulgaris* durchgeführt (vgl. die anatomischen und entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen von ZIMMERMANN 1939, 1959; ZIMMERMANN, WOERNLE und WARTH 1953; BECK 1954; RATHFELDER 1954, 1956 und AUER 1960).

Die Kotyledonen von *Pulsatilla* weisen im Vergleich zu den Laubblättern eine einfachere Gestalt auf. Auch methodisch ist ihre Untersuchung leichter: die Blätter sind in den jüngsten Stadien nicht gefaltet, dünn und besitzen keine Haare, so daß es bei entsprechender Fixierung und Färbung gut möglich ist, eine ganze Folge ontogenetischer Stadien in Totalpräparaten zu erhalten.

B. Methode

Mikrotomschnitte[1]. Die Fixierung und Färbung der Schnitte erfolgte im wesentlichen in Anlehnung an die Vorschriften von JOHANSEN (1940). Das vorwiegend junge Material wurde fixiert mit Formalin-Eisessig-Alkohol (Dauer 18—20 Std.) und dehydriert mit tertiärem Butylalkohol; die Einbettung geschah in Paraffin vom Schmelzpunkt 52—53° C bzw. 68—72° C.

Einfache Übersichtspräparate wurden mit Hämatoxylin nach MAYER angefärbt. Für eine Unterscheidung von verholzten und zellulosehaltigen Zellwänden erwies sich eine Doppelfärbung mit Safranin und Fastgreen FCF als sehr nützlich. Die Darstellung meristematischer Gewebe (vor allem Procambium) gelang sehr gut mit der von FOSTER (1934) angegebenen Tannin-Eisenchlorid-Safranin-Methode.

Totalpräparate. Die Keimung der Samen erfolgte in Petrischalen im Thermostaten bei einer Temperatur von 28° C. Um die jüngsten Stadien der Keimblätter unbeschädigt zu erhalten — sie sind bis zu einer Länge von etwa 4 mm noch in der Samenschale und von Endosperm umgeben —, wurden nach Entfernung der

[1] Eine ausführliche Darstellung dieser Methode findet sich bei HÖSTER (1960).

Fruchtschale die Samen vorsichtig gequetscht. Ältere Stadien stammten aus Blumentopf-Aussaaten bzw. vom Versuchsfeld.

Das gesamte Material wurde mit Formalin-Eisessig-Alkohol fixiert und in einer 2,5%igen Natronlauge im Thermostaten bei 28—30° C (Dauer 4—6 Tage) aufgehellt. Gefärbt wurde nach FOSTER (1950) mit einer 1%igen Lösung von Safranin (in gleichen Teilen abs. Alkohol und Xylol).

Technische Hilfsmittel. Bei der Untersuchung des Protoxylemverlaufs erwies sich das *polarisierte Licht* sowohl bei Mikrotomschnitten als auch bei Totalpräparaten als sehr nützlich (RATHFELDER 1955). Häufig konnten jüngste Stadien des Protoxylems, bei denen die Safraninfärbung noch nicht ansprach, erst mit Hilfe des polarisierten Lichtes einwandfrei identifiziert werden.

Die anatomischen Präparate wurden zum größten Teil mit dem Ultraphot II (Zeiss) fotografiert.

C. Ergebnisse

I. Die Differenzierung der primären Bündelgewebe

1. Das Procambium

Das Procambium soll nach HELM (1931) definiert werden. Die ersten procambialen Zellen des Embryos entstehen im späteren Zentralzylinder („procambial core" nach ESAU 1954). In dem nur 0,55 mm langen Embryo (Abb. 1), der schon wenige Tage nach Beginn der Keimung fixiert wurde, befindet sich in der Mitte der embryonalen Achse eine Zone, die sich durch Zellen mit ovalen bis sehr langgestreckten Kernen auszeichnet, den Procambiumzellen.

Aus Abb. 1 sowie aus Querschnitten durch entsprechende Stadien ist zu entnehmen, daß sich zu diesem Zeitpunkt weder Protoxylem noch Protophloëm aus dem Procambium entwickelt haben.

Das Procambium differenziert sich aus der embryonalen Achse in *acropetaler* Richtung in die sich bildenden Kotyledonen. Während in diesem jungen Embryo noch kein Procambium in die Keimblätter abgegeben wird, ziehen in Abb. 2, einem späteren Stadium, bereits voll spiralisierte Tracheiden in die beiden Kotyledonen. Zwischen den beiden Keimblättern der Abb. 2 befindet sich eine Zellgruppe, die sich durch eine stärkere Färbbarkeit von dem umgebenden Gewebe abhebt. Sie stellt den Vegetationspunkt dar, gliedert aber in diesem Entwicklungsstadium noch keine Blattprimordien ab.

Bei der Differenzierung des Procambiums handelt es sich zunächst nur um eine einzige Reihe von Zellen in den Kotyledonen. Diese Zellkette teilt sich dann mehr oder weniger gleichzeitig längs, so daß der Procambiumstrang aus deren Teilungen entsteht. Abb. 3 zeigt als Folge der Längsteilung ein Beispiel: die Querwände der Procambiumzellen liegen alle auf gleicher Höhe, dadurch erscheinen die Zellen gruppenweise angeordnet.

Diese Regelmäßigkeit in der Anordnung verwischt sich allerdings beim weiteren Wachstum durch eine unterschiedliche Ausdehnung der

Abb. 1

Abb. 2

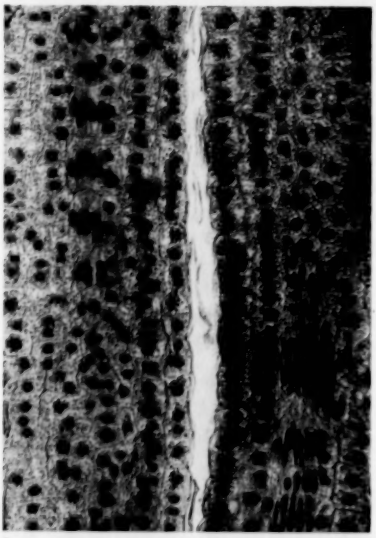


Abb. 3

Abb. 1—3
Mediane Längsschnitte durch den Keimling.

Abb. 1. Anlage des Procambiums in der embryonalen Achse. Blattlänge etwa 0,2 mm. Färbung: Hämatoxylin. 190/1

Abb. 2. Schnitt durch den Vegetationspunkt. Tracheidenstränge ziehen bereits in die Kotyledonen. Blattlänge etwa 2,1 mm. Färbung: Safranin-Fastgreen FCF. 205/1

Abb. 3. Procambiumzellen in den Kotyledonen gruppenweise angeordnet (der Procambiumstrang ist teilweise angeschnitten). Blattlänge etwa 2,1 mm. Färbung: Safranin-Fastgreen FCF. 190/1

einzelnen Zellstränge in der Längsrichtung. Oft ließ sich dieses an Kernteilungsfiguren beobachten: bereits in der frühen Telophase wurden die aus einer Längsteilung entstandenen Zellen durch diese ungleiche Ausdehnung aneinander vorbeigeschoben.

In die Spreite jedes Keimblattes führt anfänglich nur ein einziger Procambiumstrang, der sich etwas oberhalb der Basis der Spreite verzweigt und nach jeder Seite ein laterales Bündel[1] abgibt. Diese laufen annähernd parallel zum medianen Bündel[1] und verbinden sich in der Blattspitze wieder mit ihm. Von den Hauptlateralen zweigen kleine Seitenadern ab, zunächst aber nur zum Blattrand hin. Zu diesem Zeitpunkt besitzen die Kotyledonen ein *offenes Bündelsystem* (Abb. 13a). Die anastomosierenden Adern werden später angelegt. Durch diese 3 Hauptbündel ist im groben das Muster der späteren Leitbündel aller *Pulsatilla*-Blätter schon sehr früh (Blattlänge etwa 0,75—1,25 mm) vorgezeichnet.

Die Differenzierung des Procambiums erfolgt zumindest bei der Mediane und den Hauptlateralen acropetal, und die Bündel treten nie diskontinuierlich auf, wie aus Schnittserien geschlossen werden konnte. Insofern stimmen diese Ergebnisse völlig mit denen anderer Autoren (z. B. Beck 1954) überein. Über die Sonderstellung der basalen Adern siehe S. 87.

2. Das Protoxylem

a) Die Entwicklung der Protoxylemzelle. Das Protoxylem wird verschieden definiert; entweder ontogenetisch als die zuerst angelegten Gefäßelemente (Zimmermann 1959, S. 113), oder es werden entsprechend der Erstdefinition von Russow (1872) die besonders englumigen Tracheiden als Protoxylem bezeichnet. In der Praxis decken sich diese beiden Definitionen meistens, weil die ontogenetisch zuerst angelegten Gefäßelemente auch englumig sind. Grundsätzlich soll hier die von Zimmermann vertretene Definition angewendet werden.

Im allgemeinen geht das Protoxylem aus dem Procambium hervor, wie es auch Rathfelder (1954) betont hat. Die Umwandlung einer plasmareichen Procambiumzelle in eine Protoxylemzelle erfolgt in mehreren Schritten. Nach den Untersuchungen an jungen Stadien der Keimblätter von *Pulsatilla* lassen sich 4 Entwicklungsstufen vom Procambium bis zum Protoxylem unterscheiden:

Stufe 1: Vergrößerung der Zelle, Kontraktion des Protoplasten bei unverdickter primärer Zellwand, Auftreten von cytoplasmatischen Bändern (= „expansion" nach Scott, Sjaholm und Bowler 1960).

Stufe 2: Verdickung der primären Zellwand (= „thickening" nach Scott et al.).

[1] Das mediane Bündel des Keimblattes soll abgekürzt als „Mediane" (M), die beiden großen lateralen Bündel sollen als „Hauptlateralen" (L und L′) bezeichnet werden (Abb. 12).

Stufe 3. Bildung der verholzten sekundären Zellwand als Ring- oder Spiralverstärkung; Cytoplasma und Nucleus noch vorhanden (= „lignification" nach SCOTT et al.; „walled with contents" nach JACOBS und MORROW 1957).

Stufe 4. Reifes Protoxylem ohne Zellinhalt (= „fully mature" nach ESAU 1942; „walled and without contents" nach JACOBS und MORROW).

Es handelt sich dabei um Veränderungen, die in ein und derselben Zelle vor sich gehen; eine reife Protoxylemzelle hat also alle vier Stadien durchlaufen. In der Mediane dauert dieser Entwicklungsprozeß viel länger als in den später angelegten Lateralen; deshalb beschränken sich die folgenden Beobachtungen im wesentlichen auf das mittlere Leitbündel.

Vorstufe des Protoxylems. In dem ersten Stadium der Protoxylembildung (Stufe 1) treten cytoplasmatische Bänder auf, die als Vorläufer der verholzten Verdickungen angesehen werden können. Ob allerdings eine kausale Verknüpfung dieser beiden Phänomene besteht, ist nach ROELOFSEN (1959, S. 252f.) noch nicht eindeutig geklärt.

Eine solche schrittweise Differenzierung von der Procambium- bis zur Protoxylemzelle mit verdickter Primärwand läßt sich bei Abb. 4 verfolgen. In diesem Medianbündel besteht die apikalwärts gelegene Zelle noch aus Procambium, während die basal anschließende Zelle sich schon differenziert hat. Aus Nachbarschnitten war zu entnehmen, daß deren Protoplast bereits etwas kontrahiert ist. Es ist ferner auf der Abbildung eine Streifung zu erkennen, die wohl in der Hauptsache protoplasmatischer Natur ist, die aber auch auf erste Anlagen der später einsetzenden sekundären Wandverdickung hindeuten könnte. Dabei handelt es sich noch nicht um verholzte Spiral- bzw. Ringtracheiden, wie eine Untersuchung mit polarisiertem Licht ergab. An diese Vorstufe des Protoxylems schließt eine stark gefärbte Zelle an, die bereits eine verdickte primäre Wand aufweist (Stufe 2).

Auf Grund des Studiums an etlichen Quer- und Längsschnitten soll dieses erste Stadium in der Ontogenie des Protoxylems noch nicht als Protoxylem bezeichnet werden, sondern es soll erst dann davon gesprochen werden, wenn die *Zellwand* (primäre oder sekundäre) *verdickt* ist und sie damit infolge ihres charakteristischen Aufbaus im polarisierten Licht aufleuchtet (Stufe 2—4). JACOBS und MORROW (1957) benennen dagegen schon diese erste Stufe als „contracted xylem" wegen der Kontraktion des Protoplasten.

Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Kontraktion des Protoplasten um einen durch die Fixierung hervorgerufenen Effekt (vgl. Querschnitte bei JACOBS und MORROW 1957, S. 826, Abb. 3, sowie DE SLOOVER 1958, Tafel 9, Abb. 96). Aber auch im Falle einer Fixierungsfolge ist es recht bemerkenswert, daß das Cytoplasma auf diesem Stadium durch eine Kontraktibilität während der Fixierung ausgezeichnet ist. Dieses erste Stadium läßt sich bei Schnittserien schlecht verfolgen und bei Totalpräparaten ist eine Identifizierung unmöglich.

Weitere Entwicklungsstufen des Protoxylems sind in neuerer Zeit zwar mehrfach gefunden, aber kaum beschrieben worden (u. a. ESAU 1942, MILLER und WETMORE 1945a, b, JACOBS und MORROW 1957, DE SLOOVER 1958, SCOTT, SJAHOLM und BOWLER 1960). Alle Autoren

sind mit Esau der gleichen Meinung, daß ein Protoxylemelement dann als reif bezeichnet wird, wenn die Sekundärwand verholzt ist und die Zelle weder Nucleus noch Cytoplasma mehr besitzt. Weniger Übereinstimmung herrscht jedoch darüber, welche der vorangehend erwähnten Änderungen erfüllt sein müssen, damit man vom Protoxylem sprechen darf.

Abb. 4

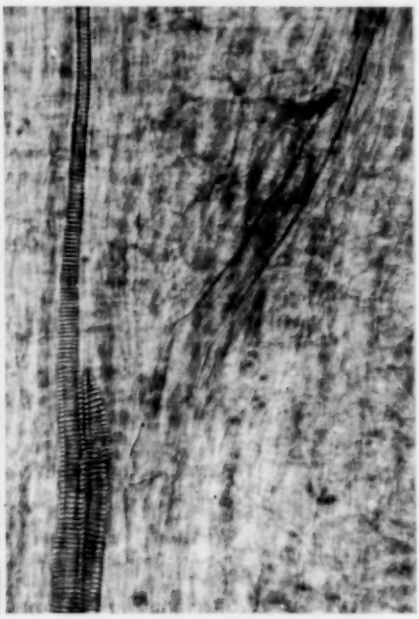


Abb. 5

Abb. 4. Transversaler Längsschnitt durch das Hauptbündel eines Keimblattes. Anfangsstadien der Protoxylem-Entwicklung. Näheres im Text. Blattlänge 1,50 mm. Färbung: Tannin-Eisenchlorid-Safranin. 380/1

Abb. 5. Aufgehelltes Keimblatt an der Spreitenbasis. Die Hauptlaterale besteht noch aus glattem Protoxylem, die Mediane ist spiralisiert. Blattlänge 2,98 mm. Färbung: Safranin. 400/1

Vor allem die beiden ersten Stufen werden in der Literatur manchmal nicht klar unterschieden. Während Miller und Wetmore (1945) sowie Jacobs und Morrow (1957) keine Verdickung der Primärwand beobachtet haben, beschreibt Esau (1942) dagegen als Vorstufe des reifen Protoxylems eine auffallende Verdickung und starke Färbbarkeit der Primärwand. Diese soll nach Esau (1953) nicht auf einer Ablagerung von zusätzlicher Wandsubstanz beruhen, sondern auf einer Schwellung der Intercellularsubstanz: die Zelluloseschicht bleibt dünn, während die Pectinlamellen, die nach Roelofsen (1959, S. 69) vor allem auf die primären Wände beschränkt sind, in der Dicke anwachsen.

Dieses der Verholzung unmittelbar vorausgehende Stadium ist im allgemeinen wahrscheinlich kaum feststellbar (vgl. Diskussion), in den Keimblättern von *Pulsatilla* tritt es jedoch in den frühen Phasen ihrer Ontogenie sehr klar hervor bei der Entwicklung der Hauptbündel und

ist auch mit Hilfe von polarisiertem Licht einwandfrei nachzuweisen. Auf diese zweite Stufe soll weiter unten besonders eingegangen werden.

Dagegen herrscht über das dritte Entwicklungsstadium völlige Übereinstimmung. So besitzen selbst anscheinend wandfertige Schraubentracheiden aus Nebenblättern von *Vicia faba* zu 80% noch einen Zellkern und Plasma, wie RESCH (1955) gezeigt hat. Diese noch lebenden Protoxylemzellen können sich nur in der Längsrichtung aktiv ausdehnen; denn die Anlage einer sekundären Wand erfolgt nach SCOTT et al. nur dann, wenn die Zelle bereits annähernd ihren maximalen Durchmesser erreicht hat.

Das glatte Protoxylem. Ausgehend von Totalpräparaten zeigt dieses Protoxylemstadium (Stufe 2) keine besonderen Konturen, wie sie z. B. der spiralisierten Zelle eigen sind (vgl. Abb. 5); die Wand dieser Zelle ist noch glatt und unverholzt. Aus diesem Grund soll diese Entwicklungsstufe als *glattes Protoxylem* bezeichnet werden. Für die weiteren Untersuchungen sei daher definiert:

a) *glattes unreifes Protoxylem:* die zukünftigen Gefäßzellen mit verdickter Primärwand ohne Sekundärwand (Stufe 2);

b) *spiralisiertes unreifes Protoxylem:* die Protoxylemzellen mit verholzter Sekundärwand und Zellinhalt (= „walled with contents", Stufe 3);

c) *spiralisiertes reifes Protoxylem:* die Protoxylemzellen mit verholzter Sekundärwand ohne Zellinhalt (= „walled and without contents", Stufe 4).

Nun zeigt allerdings auch das Protophloëm, das ebenso wie das Protoxylem aus dem Procambium hervorgeht, eine Verdickung der Primärwand. Beide Zellarten lassen sich aber in den Blattquerschnitten sehr gut unterscheiden, einmal durch ihre Lage (Protophloëm abaxial, Protoxylem adaxial) und dann durch ihren Glanz: das Protophloëm hat nämlich auffallend perlmutterartig schillernde Wände (vgl. ESAU 1941).

Abb. 6 stellt ein sehr frühes Stadium in der Entwicklung des medianen Leitbündels eines Keimblattes dar. Es ist in diesem Fall das Protoxylem noch gar nicht ausgebildet, während das Protophloëm schon eine Verdickung der primären Wand zeigt. Diese leuchtet im polarisierten Licht im Gegensatz zur Wand der glatten Protoxylemzelle desselben Entwicklungsstadiums (Abb. 7b) nur schwach auf. Auch die Zellform der beiden Gefäßelemente ist ganz verschieden: Die Protoxylemzellen sind im Querschnitt meist sechseckig, die Protophloëmzellen dagegen mehr quadratisch bis rechteckig.

Die Unterscheidung von glattem und spiralisiertem Protoxylem läßt sich anhand von Querschnitten gut verfolgen. In den Abb. 7 und 8 ist das Medianbündel desselben Keimblattes quer geschnitten. Während im Lichtmikroskop bei Abb. 7a die Intensität der Zellwandfärbung von der Protoxylem- und der Protophloëmzelle übereinstimmt, finden sich in Abb. 8a Unterschiede. Dort handelt es sich bereits um spiralisiertes

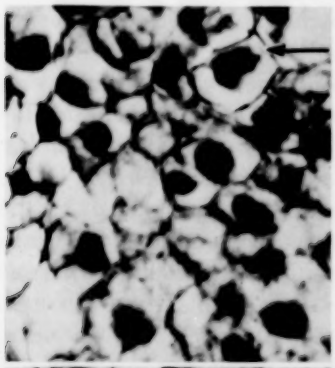


Abb. 6a

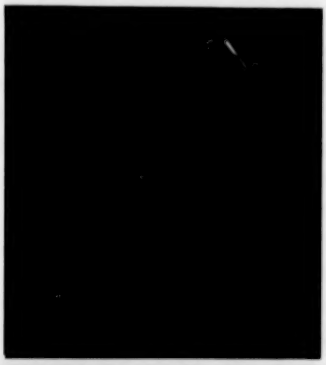


Abb. 6b

Abb. 7a

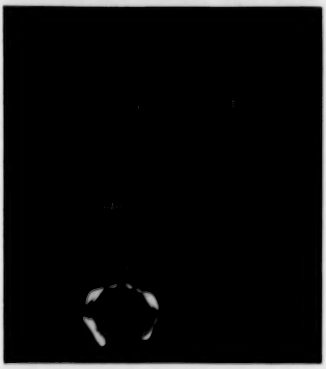


Abb. 7b

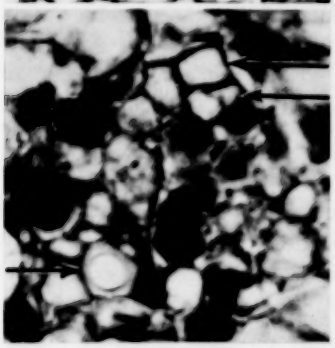


Abb. 8a

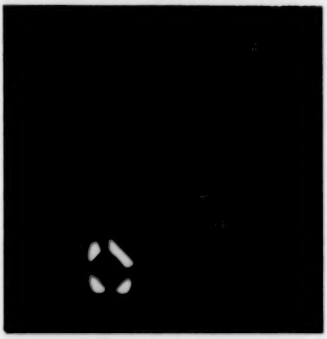


Abb. 8b

Abb. 6a. Querschnitt durch das Medianbündel in der Spreitenbasis eines sehr jungen Keimblattes. Protophloëm unreif, Protoxylem noch nicht ausgebildet. Färbung: Safranin-Fastgreen FCF. 770/1

Abb. 6b. Dasselbe im polarisierten Licht

Abb. 7a u. 8a. Querschnitte durch das Medianbündel in der Spreitenmitte eines jungen Keimblattes. Die Schnittstellen sind nur 80—100 μ voneinander entfernt. Färbung: Safranin-Fastgreen FCF

Abb. 7b u. 8b. Dasselbe im polarisierten Licht. Das Protophloëm leuchtet bei polarisiertem Licht im Vergleich zum Protoxylem nur sehr schwach auf und ist deshalb fotografisch nicht wiederzugeben

Abb. 7. Glattes unreifes Protoxylem (keine Verholzung), reifes Protophloëm. 840/1

Abb. 8. Spiralisiertes reifes Protoxylem (typisches Bild bei polarisiertem Licht), reifes Protophloëm. 800/1 (*Pp* Protophloëm, *Px* Protoxylem)

Protoxylem, die Zellwand spricht nicht mehr auf eine Färbung mit Fastgreen an.

Auch bei der Untersuchung im *polarisierten Licht* ergeben sich bei diesen beiden Protoxylem-Entwicklungsstufen Unterschiede. Bei einer spiralisierten Protoxylemzelle leuchtet die Zellwand sehr stark auf (Abb. 8b), wobei ein dunkles Kreuz über der Zelle liegt. Nach Rathfelder (1955) entsprechen die Balken dieses Kreuzes den beiden Schwingungsrichtungen der Nicols. Wesentlich geringer leuchtet dagegen die glatte Protoxylemzelle in Abb. 7b auf, das dunkle Kreuz ist nur noch schwach angedeutet. Auch schillert diese Zelle im polarisierten Licht etwas grünlich, eine Eigenschaft, die sie mit den Protophloëmelementen gemeinsam hat. Das beruht auf der Anfärbung der Zellwände mit Fastgreen und ist damit ein Hinweis, daß noch kein Lignin in den Zellulosewänden vorhanden ist.

Um nun bei einer möglichst großen Anzahl von Keimblättern das Vorhandensein und vor allem den Verlauf des glatten Protoxylems verfolgen zu können, wurden aufgehellte Totalpräparate ausgewertet, da natürlich an ihnen die Verzweigungen der Bündel besonders deutlich werden. Abb. 5 zeigt einen Ausschnitt aus einem solchen aufgehellten Keimblatt, bei dem die Mediane schon aus spiralisiertem, die Hauptlaterale dagegen noch aus glattem Protoxylem besteht. Auch im Totalpräparat leuchtet das glatte Protoxylem bei polarisiertem Licht auf.

Ringtracheiden sind in den kaum gestreckten Stadien der Keimblätter von Spiraltracheiden nur schwer zu unterscheiden; daher soll für beide Arten die Bezeichnung „*spiralisiert*" verwendet werden. Bei den jungen Kotyledonen von *Pulsatilla* konnten in der Nähe der Spreitenbasis in mehreren Fällen einwandfrei Tracheiden mit ringförmigen Verdickungsleisten festgestellt werden.

b) Der zeitliche Verlauf der Differenzierung des Protoxylems. Die folgenden Zahlenangaben sind alles Durchschnittswerte aus verschiedenen Messungen; untersucht wurden etwa 160 Keimblätter jeden Alters, vor allem aber junge Stadien.

Glattes Protoxylem. Noch bevor sich das Protoxylem ausdifferenziert, ist schon Protophloëm in den Kotyledonen vorhanden (Abb. 6). Bei einer Blattlänge von etwa 1,0 mm beginnt sich aber das glatte unreife Protoxylem in der Mediane 200—450 μ von der Basis entfernt auszubilden. Das entspricht ungefähr der Stelle, wo die beiden Hauptlateralen L und L′ von der Mediane abzweigen. Von hier differenziert es sich kontinuierlich sowohl acropetal in die Spreite wie auch basipetal in den Blattstiel.

In den beiden Hauptlateralen L und L′ tritt das glatte Protoxylem zuerst bei einer Blattlänge von etwa 1,55 mm auf, die Differenzierung erfolgt ebenfalls acropetal von der Abzweigung aus. Dabei herrscht meist eine asymmetrische Entwicklung: während die eine Hauptlaterale schon bis zur Hälfte ihrer Länge glattes Protoxylem besitzt, beginnt die andere erst mit der Anlage.

Die Zellen können sehr lang werden durch selbständiges Wachstum, da sie stets noch lebenden Inhalt führen. Während sie in Abb. 4 die schmalrechteckige Form von Procambiumzellen aufweisen mit einer Länge von etwa 50—70 μ, können sie nach der Streckung bis über 250 μ lang werden. Dabei werden die Endwände der glatten Protoxylemzellen im Laufe der Entwicklung immer schräger. Sie können sogar sehr spitz werden, so daß das Bild entsteht, als würden die Zellen aneinander vorbeigleiten.

Während das glatte Protoxylem zum Teil die gesamte Mediane einnehmen kann (Abb. 14b), besteht bei den Hauptlateralen und den Seitenadern höherer Ordnung nur noch der distale Teil aus glattem Protoxylem, die Spiralisierung folgt meist sehr schnell. Besonders häufig ist das glatte Protoxylem in jenen Keimblättern vertreten, die sich noch innerhalb der Samen- und Fruchtschale befinden; dagegen fehlt es fast gänzlich bei Kotyledonen ausgekeimter Samen.

Bisher ist diese Entwicklungsstufe noch nicht in ihrem Verlauf untersucht worden. JACOBS und MORROW (1957) haben zwar ein Zwischenstadium gefunden, das noch keine oder nur eine ganz geringe sekundäre Wandverdickung ausgebildet hatte. Das Differenzierungsmuster wurde aber nicht näher verfolgt.

Beginn der Spiralisierung. Bei etwa 1,40 mm Blattlänge bahnt sich als zweiter Schritt die Ausbildung einer Sekundärwand an. Im Gegensatz zu dem einheitlichen Entstehungsort für das glatte Protoxylem kann sich das spiralisierte von mehreren Stellen aus differenzieren. In der Mediane beginnt seine Entwicklung — von wenigen Ausnahmen abgesehen — zumeist an der Blattbasis oder an der Blattspitze.

Kurze Zeit danach tritt bereits das erste *spiralisierte reife Protoxylem* in der Mediane etwas unterhalb der Spitzenregion des Blattes auf bei einer Blattlänge von etwa 1,60 mm; die Differenzierung erfolgt basipetal.

Es ist auffällig, daß schon in sehr jungen Stadien der Kotyledonen die Zahl der Tracheiden in der Blattspitze stark zunimmt. Bei einem Keimling von 1,65 mm Länge traten 80 μ von der Spitze entfernt im Querschnitt bereits drei reife Protoxylemzellen auf, in der Blattmitte war nur eine glatte, an der Spreitenbasis aber wieder eine spiralisierte unreife Protoxylemzelle vorhanden. Dieses keulige Anschwellen der Leitbündel mit 15—20 nebeneinanderliegenden Tracheiden in der Spitze des ausgewachsenen Keimblattes deutet auf eine Hydathode hin.

Die Anlage einer sekundären Wand als Versteifung in den Hauptlateralen erfolgt an verschiedenen Stellen bei einer Blattlänge von etwa 1,80—2,10 mm. Es überwiegen dabei aber wieder zwei Spiralisierungszentren, d.h. bevorzugte Orte für den Beginn der Tracheidenspiralisierung, nämlich die Spitze und die Basis des Blattes.

Bei einer Blattlänge von 2,80—3,20 mm besitzt das Keimblatt voll ausgebildete Protoxylemstränge sowohl in der Mediane als auch in den

beiden Hauptlateralen. Abb. 9 gibt schematisch den zeitlichen Verlauf der Differenzierung wieder.

Nach JACOBS und MORROW (1958), die ähnliche Werte für den Beginn der Spiralisierung fanden, tritt die Gefäßdifferenzierung stets dann ein, wenn eine ganz bestimmte Größenordnung in der Blattlänge erreicht ist. Man könnte also demnach von einer kritischen Blattlänge sprechen, oberhalb derer es der Pflanze nicht mehr möglich ist, ohne Gefäßdifferenzierung die physikalische Diffusion von Zelle zu Zelle aufrechtzuerhalten.

Muster der Protoxylem-Differenzierung. Dieses ist weitaus komplizierter als das des Procambiums, aber es lassen sich gemeinsame Züge in der Entwicklung bei allen untersuchten

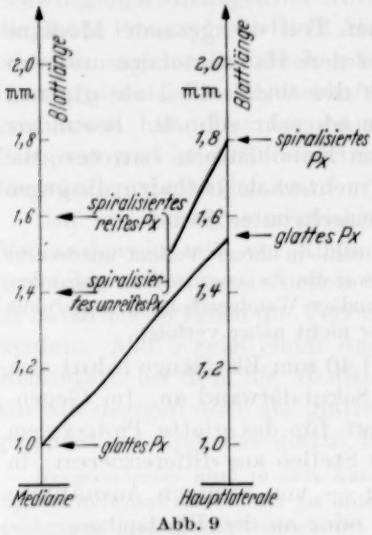


Abb. 9

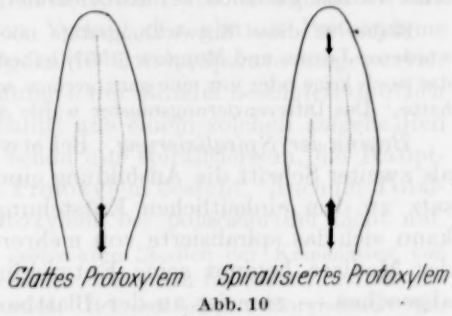


Abb. 10

Abb. 9. Der Zeitpunkt des ersten Auftretens der verschiedenen Protoxylemstadien in der Mediane und Hauptlaterale in Abhängigkeit von der Blattlänge (schematisch) (*Px* Protoxylem)

Abb. 10. Die Differenzierungsrichtung des Protoxylems (schematisch)

Keimblättern finden (Abb. 10). Während das glatte unreife Protoxylem von *einem* Zentrum aus entsteht und sich kontinuierlich entwickelt, verläuft die Differenzierung des spiralisierten Protoxylems ganz anders: hier finden wir für die anfängliche Spiralisierung *zwei* Bildungsherde, so daß die Differenzierung diskontinuierlich erfolgt. Meist überwiegt allerdings die Entwicklung von einem Zentrum aus und das spiralisierte Protoxylem ist von diesem schon weiter fortgeschritten als vom anderen. In zwei Drittel der Fälle beginnt die Spiralisierung an der Basis der Keimblätter, in einem Drittel an der Spitze. Die *Reifung* der Protoxylemzellen beginnt fast immer zuerst *in der Blattspitze* und setzt sich von dort aus basipetal fort.

Vergleichbare Ergebnisse bei Keimblättern liegen in der Literatur nicht vor, vermutlich weil bisher nicht zwischen glattem und spiralisiertem Protoxylem unterschieden wurde. Eine diskontinuierliche Entwicklung des spiralisierten Protoxylems scheint aber die Regel zu sein.

II. Die Adernetzdichte in der Ontogenie des Keimblattes

Unter *Adernetzdichte* verstehen wir das Verhältnis von Aderlänge zur Blattfläche (mm/mm²).

Ontogenetisch ist die Adernetzdichte bisher von SCHUSTER (1908) bei Laubblättern eingehender untersucht worden. Bei der Entwicklung der Laubblätter fand er einen nahezu konstanten Wert für die Adernetzdichte. Es fehlten jedoch Untersuchungen, die sich speziell mit der Adernetzdichte in der Ontogenie der Keimblätter befaßten. Es galt daher nachzuprüfen, ob diese bei den Kotyledonen in der Ontogenie eine Abwandlung erfährt.

Für die Bestimmung der Adernetzdichte wurden etwa 160 Keimblätter mit Hilfe eines Mikroprojektors gezeichnet, die Messung der Blattfläche erfolgte mit einem Planimeter und die der Aderlänge mit einem Kurvenmesser. Bei der Längenmessung wurde bereits glattes Protoxylem mit einbezogen und dort, wo zwei oder mehrere Tracheiden nebeneinanderlagen, wurde nur eine berücksichtigt. Als einheitliche Bezugsgröße für das Alter des Blattes diente die Blattlänge.

Tabelle. *Blattwachstum und Nervatur des Keimblattes in Abhängigkeit von der Blattlänge*

Zugrunde gelegt ist ein normales ausgewachsenes Keimblatt von 9 mm Länge, dessen Aderlänge und Blattfläche je 100% betragen sollen.

Blattlänge (mm)	Blattfläche (%)	Aderlänge (%)	Adernetzdichte (mm/mm²)
1	0,6	0	0
2	2,1	2,8	2,50
3	4,7	8,5	4,05
4	12,1	24,0	5,00
5	24,6	39,6	4,15
6	39,2	54 8	3,10
7	58,0	69,5	2,85
8	78,4	84,6	2,55
9	100,0	100,0	2,30

Bei der Entwicklung der Kotyledonen lassen sich grundsätzlich zwei verschiedene Phasen unterscheiden: 1. die *intraseminale Phase*, in der sich der Keimling noch im Samen befindet und vom Endosperm ernährt wird, und 2. die *extraseminale Phase*.

Die Entwicklung der Keimblätter ist in den beiden vorgenannten Phasen ganz verschieden. In der intraseminalen Phase überwiegt das Längenwachstum, die jüngsten Blätter sind äußerst schmal. Der Grund dafür liegt in den Raumverhältnissen des Samens. Erst kurz vor dem Verlassen der Samenschale, wenn das Endosperm nahezu aufgebraucht ist, setzt bei den Keimblättern ein verstärktes Breitenwachstum ein. Das eigentliche Flächenwachstum beginnt erst in der extraseminalen Phase.

Die Beziehungen zwischen Aderlänge und Blattfläche in der Ontogenie des Keimblattes sind im einzelnen aus der Tabelle zu entnehmen. Bei einer Blattlänge von etwa 4 mm ist bereits ungefähr ein Viertel der gesamten Aderlänge eines Blattes auf nur 12% der Gesamtfläche des Blattes ausgebildet. Dieser Aufbau eines möglichst langen Adernetzsystems auf kleinster Blattfläche in der intraseminalen Phase ist für den Keimling die Voraussetzung für den Beginn eines starken Flächenwachstums in der extraseminalen Phase.

Es zeigt sich also hier ein deutlicher Unterschied in den beiden Entwicklungsperioden: während der intraseminalen Phase steigt die Adernetzdichte stark an (Abb. 11) und erreicht sehr hohe Werte (bis zu 5,0). In der extraseminalen Phase, d.h. nach dem Maximum der Adernetzdichte bei etwa 4 mm Blattlänge sinkt dieser Wert zunächst schneller, dann langsamer wieder ab, um schließlich nahezu asymptotisch bei 2,0 auszulaufen. Das Maximum der Kurve trennt die beiden Entwicklungsperioden des Keimlings voneinander.

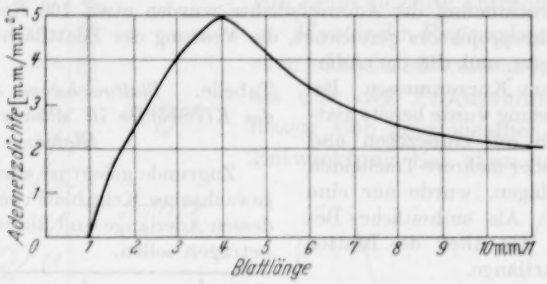


Abb. 11. Die Dichte des Adernetzes in der Ontogenie des Keimblattes (Abszisse: Blattlänge, Ordinate: Adernetzdichte)

Im Gegensatz zu der fast konstanten Adernetzdichte in der Ontogenie der Laubblätter (SCHUSTER 1908) finden wir bei der Keimblatt-Entwicklung von *Pulsatilla* eine gesetzmäßige Änderung.

III. Die Herausbildung des Adernetzmusters

Die zuerst angelegten Bündel, die Mediane *M* und die beiden Hauptlateralen *L* und *L'*, sind oben schon erwähnt worden. Im allgemeinen lassen sich diese drei Bündel (Hauptadern) auch am fertigen Blatt noch deutlich von den später angelegten Bündeln unterscheiden, da sie kräftiger als diese entwickelt sind.

Um die Ausbildung des Adernetzes besser verfolgen zu können, wurden einheitliche Bezeichnungen für die einzelnen Leitbündel verwendet. Diese sind aus Abb. 12 zu entnehmen. Die Mediane ist die Symmetrieachse des ganzen Blattes, dementsprechend ist die Benennung der Adern in beiden Blatthälften dieselbe (z.B. *La* und *L'a*).

Eine Sonderstellung nehmen die Adern der Basis ein, die vom Blattstiel her gesehen noch vor den Hauptlateralen von der Mediane abzweigen (in Abb. 12 und 15 punktiert.) Diese Leitbündel sollen als *Basalnervatur* α bezeichnet werden (siehe S. 87).

Das Adernetzmuster läßt sich ebenso wie die einzelnen Bündel sowohl in der procambialen als auch in der Protoxylemphase verfolgen. Allerdings werden mit zunehmendem Alter die Kotyledonen dicker, was ein Erkennen des Procambiums (nicht aber des Protoxylems) erschwert. Da jedoch das Protoxylem den Verlauf des Procambiums widerspiegelt, kann die Darstellung bei älteren Stadien auf die Entwicklung des tracheidalen Netzes beschränkt werden.

1. Die Anlage des procambialen Netzes

Bei einer Blattlänge von 0,6 mm zieht bereits als medianes Bündel ein procambialer Strang bis zur Blattspitze; wenig später erfolgt die

Anlage der Hauptlateralen. Die Seitenadern zweiter Ordnung werden erst dann abgegliedert, wenn die Mediane schon wenigstens zur Hälfte aus glattem Protoxylem besteht. Hat eine Spiralisierung des mittleren Leitbündels eingesetzt, so wird in den Hauptlateralen glattes Protoxylem angelegt (Abb. 5).

Bis zu etwa 1,9—2,0 mm langen Blättern ist das procambiale Adernetz noch offen, d.h. es sind keine Anastomosen vorhanden (Abb. 13a). Die ersten Aderverbindungen im Procambium erscheinen aber bald darauf (Abb. 13b), und fast gleichzeitig treten auch Seitenadern dritter Ordnung auf, die sich gut in das Muster einfügen. Zwischen Mediane und Hauptlateralen werden Procambiumstränge erst dann angelegt, wenn deren Abstand mindestens etwa 150 μ beträgt. Es liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei dieser Musterbildung um eine *Hemmwirkung* im Sinne BÜNNINGs (1953) handelt.

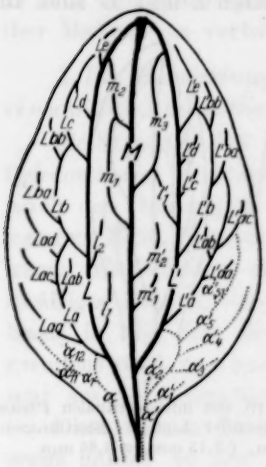


Abb. 12. Die Nomenklatur des Adernetzes bei einem ausgewachsenen Keimblatt (Basalnervatur α punktiert). Blattlänge 9,26 mm

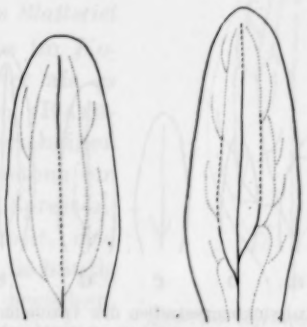


Abb. 13a u. b. Die Anlage des procambialen Adernetzes (Procambium punktiert, glattes Protoxylem gestrichelt, spiralisiertes Protoxylem mit durchgehender Linie). a Offenes Adernetz, Blattlänge 1,90 mm; b erste Anastomosen. In diesem Fall ist die Spiralisierung nur von der Basis aus erfolgt. Blattlänge 2,10 mm

2. Die Ontogenie des tracheidalen Netzes

In Abb. 14 sind die Entwicklungsstadien des Adernetzes in der intraseminalen Phase zusammengestellt (nur Protoxylem). Dabei wird besonders deutlich, daß sich vor allem zu Beginn der extraseminalen Phase das Adernetz rasch ausweitet; es erscheinen auch zwischen den Leitbündeln erster und zweiter Ordnung weitere Adern (Abb. 14g). Anastomosen der Protoxylemstränge treten erst bei etwa 3,5 mm Blattlänge auf.

Die *Endstufe* der Entwicklung des Keimblattes mit einem *reich verzweigten* System von Bündeln stellt Abb. 12 dar. Die Seitenadern

zweiter Ordnung *anastomosieren* meist mit einer nächst höheren, was der *Venatio Goniopteridis* (ZIMMERMANN 1959, S. 277) entspricht; diejenigen dritter Ordnung enden — wie ebenfalls regelmäßig bei der Venatio Goniopteridis — fast immer frei. Bündel vierter Ordnung sind kaum vorhanden. Bei einer Blattlänge von etwa 8,5—9,8 mm wird die Entwicklung der Kotyledonen meist eingestellt; die Ausbildung des Adernetzes bleibt unvollständig und im Vergleich zu den Primärblättern primitiver.

Die *Asymmetrie des Adernetzes* steht bemerkenswerterweise in enger Beziehung zur Adernetzdichte. Die Hauptlateralen L und L' sind im

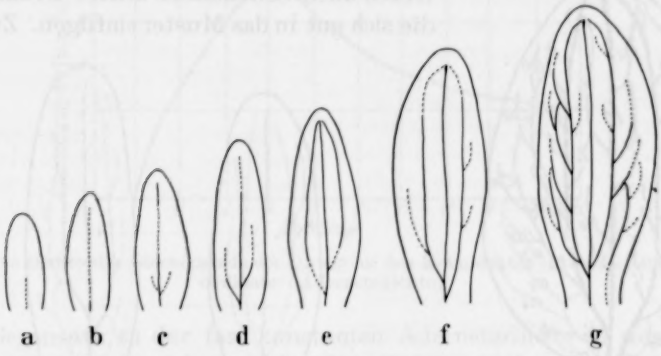


Abb. 14. Entwicklungsstadien des tracheidalen Adernetzes in der intraseminalen Phase (glattes Protoxylem gestrichelt, spiralisiertes mit durchgehender Linie). Blattlängen: a 1,22 mm, b 1,47 mm, c 1,72 mm, d 2,06 mm, e 2,44 mm, f 3,15 mm, g 3,66 mm

Normalfall wechselständig angeordnet, entsprechend ist auch die Basalnervatur α verschoben. Der Grad der Asymmetrie hängt jedoch ganz entscheidend ab von dem Ort der Abzweigung der beiden Hauptlateralen L und L' von der Mediane. In der Ontogenie treten diese Seitenadern nach der Mediane zuerst auf und bestimmen damit die ganze weitere Ausbildung des Musters.

Ein Vergleich der Abb. 12 mit Abb. 13b zeigt bei grundsätzlich *gleicher* Anlage der Hauptlateralen, daß die Blattfläche sich im Laufe der Ontogenie stark geändert hat. Der im jungen Blatt fast unmerkliche Übergang vom Blattstiel zur Spreite ist im Alter nicht mehr vorhanden, wir haben einen scharf ausgeprägten Gegensatz. Während der Blattstiel an der Ansatzstelle der Spreite nur um das 1,8fache in der Breite zugenommen hat, beträgt der Zuwachs in der Lamina (in Höhe der Abzweigung von L) schon das 5,9fache des jungen Blattes. Gleichzeitig hat sich der Abstand von Mediane zu Hauptlaterale in fast demselben Maße vergrößert, ein Zeichen dafür, daß das Breitenwachstum in der Spreite annähernd gleichmäßig erfolgt ist.

Entsprechend dieser Flächenvergrößerung an der Basis zu beiden Seiten der Mediane sind neue Adern gebildet worden. Dieser Zusammenhang zwischen Flächengröße und Adernetzdichte wird besonders dort deutlich, wo eine stärkere Asymmetrie des Adersystems vorhanden ist. So ist die Basalnervatur in derjenigen Blatthälfte mehr entwickelt, in

der die Hauptlaterale weiter von der Basis entfernt abzweigt; denn dort ist — eine Symmetrie in der Blattfläche vorausgesetzt — der Raum relativ größer.

Noch besser ausgeprägt ist die Asymmetrie des Adernetzmusters bei dem Kotyledo in Abb. 15. Da L' erst kurz unterhalb der Blattmitte von der Mediane abzweigt, ist die Basalnervatur auf dieser Seite sehr mächtig geworden und reicht fast bis zur Blattspitze (allerdings ist α' im Querschnitt dünner als L'); α' mündet ungefähr auf gleicher Höhe mit L in M und ersetzt praktisch L', ohne sich aber in der Spitze wieder mit der Mediane zu verbinden.

3. Die Entwicklung der Basalnervatur, einschließlich der seitlichen Bündel im Blattstiel

Die Struktur des Bündelsystems im *Kotyledonenstiel* ist etwas komplizierter als es nach den bisherigen Darstellungen (Rathfelder 1956, Zimmermann 1959) erscheinen kann. Es befinden sich im Stiel erstens ein kräftiges Bündel, das sich an der Spreitenbasis in die drei Hauptadern gabelt, und zweitens noch zwei zartere Bündel, die häufig nur aus 1—2 Tracheidensträngen bestehen.

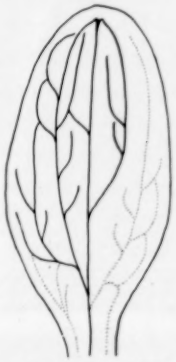


Abb. 15. Asymmetrie der Nervatur. Die Basalnervatur α (punktiert) ist in der rechten Blatthälfte mächtig entwickelt. Blattlänge 6,55 mm

Diese dünnen Bündel entspringen keineswegs immer an der Basis des Blattstieles, sondern die Abzweigung vom Hauptbündel kann auch in der Mitte des Stieles oder an der Spreitenbasis erfolgen. An der Basis des Kotyledonenstiels sind also im Querschnitt 1—3 Bündel vorhanden, kurz vor dem Eintritt in die Spreite jedoch stets drei. Die seitlichen, meist schwächeren Bündel setzen sich in der Blattfläche als Basalnervatur fort.

Bei den Primärblättern liegen die Verhältnisse ähnlich, nur sind die seitlichen Bündel des Blattstieles etwas kräftiger entwickelt. In der Blattspreite spielt die Basalnervatur meist nur eine untergeordnete Rolle. Die zu den einzelnen Blattlappen ziehenden Hauptbündel entstammen alle dem starken medianen Bündel des Stieles.

Rein *deskriptiv* gesprochen zweigen also die Basaladern als seitliche Bündel schon im Blattstiel vom Hauptleitbündel ab. Es schließt sich dann an sie der Spreitenteil der Basalnervatur acropetal an. Dieser versorgt mit seinen Verästelungen den basalen Teil des Keimblattes zu beiden Seiten der Mediane. Entsprechend der Zartheit der kleinen Nebenadern des Blattstieles ist auch die von ihnen durchzogene Fläche in der Spreite mit etwa 10—15% der Gesamtfläche des Blattes nur gering.

Entwicklungsphysiologisch ist jedoch wichtig, daß diese ontogenetische Entstehung der Basalnervatur keinesfalls immer acropetal in bezug

auf die Gesamtmorphologie des Blattes erfolgt. Schon in der procambialen Phase (z. B. Abb. 13 b) läßt sich mehrfach verfolgen, daß sich die ersten Bündelanlagen der Basaladern auch *basipetal* (in bezug auf das gesamte Blatt) herausdifferenzieren können. Das wird besonders deutlich in den Fällen, in denen die eine Hauptlaterale weiter von der Basis entfernt abzweigt; dort ist ja auch die von den Adern unversorgte Fläche am größten.

Eine solche Entwicklung der Leitbündel steht in Einklang mit der Vorstellung, daß ein *Sperreffekt* die Lage der neuen Bündel bestimmt. Zunächst wird offenbar durch diesen Sperreffekt eine weitere Anlage von Procambium im anfänglich recht schmalen Blattstiel unterdrückt. Wenn dann durch das einsetzende Breitenwachstum die bündellose Fläche an der Basis des Keimblattes relativ groß wird — wenn also die Hemmwirkung hier erlischt —, so kann an dieser Stelle neues Procambium angelegt werden. Dieses zweigt dann von den noch meristematischen Seitenadern meist unter einem rechten Winkel ab, biegt um und differenziert sich acropetal in bezug auf die Ausgliederung, aber basipetal in bezug auf das gesamte Blatt, d. h. in Richtung auf den Blattstiel.

Das gilt aber anscheinend nur dann, wenn sich aus den oben genannten Gründen kein Procambium vom Blattstiel aus acropetal differenzieren kann.

An einem transversalen Längsschnitt (Abb. 16) läßt sich ein solches Umbiegen zeigen. Die Mediane besitzt etwas unterhalb der Abzweigung von *L'* schon glattes Protoxylem; von *L* aus biegt jedoch ein Procambiumstrang um und differenziert sich basipetal in bezug auf das Blatt. Weitere Schnitte dieser Serie ergeben, daß zu diesem Zeitpunkt noch kein Anschluß an die Mediane hergestellt war. Diese sich basipetal entwickelnden Adern bleiben noch in der gesamten intraseminalen Phase procambial, obwohl sie schon sehr früh (1,6—2,0 mm Blattlänge) angelegt werden (Abb. 13 b und 16); die Verholzung beginnt erst in der extraseminalen Phase.

Allerdings läßt sich nicht für alle Fälle sicher entscheiden, ob die in bezug auf das Gesamtblatt basipetale Differenzierung der seitlichen Bündel der Basalnervatur ganz allgemein gilt. Die Entscheidung ist deshalb so schwer, weil nicht immer das Procambium eines so zarten Bündels, wie es die Basaladern bzw. die Nebenadern im Blattstiel darstellen, verfolgt werden kann. Daher muß man auch damit rechnen, daß ein Teil der seitlichen Bündel im Blattstiel sich acropetal entwickelt.

Basaler Anschluß an das Hauptbündel. Meist findet ein sich basipetal entwickelnder Procambiumstrang eine normale Verbindung mit dem Hauptbündel; offenbar war dann die Meristemtätigkeit dieser Hauptader erloschen und eine Hemmwirkung fortgefallen. Ist dagegen der Sperreffekt im basalen Teil des Blattes noch wirksam (besonders in der verengten Zone am Übergang in den Blattstiel), so wird die Differenzierung des Procambiums in ihrem basipetalen Verlauf offenbar abgebremst. Ein Anschluß eines solchen Stranges an das Hauptbündel ist dann nur möglich durch ein erneutes Umbiegen. In Abb. 17 ist eine derartige

Abb. 16

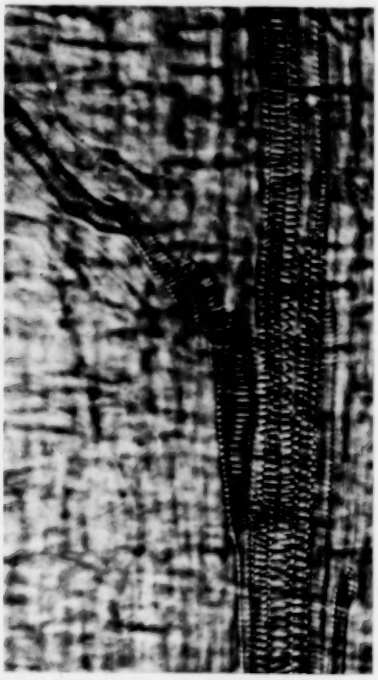


Abb. 18

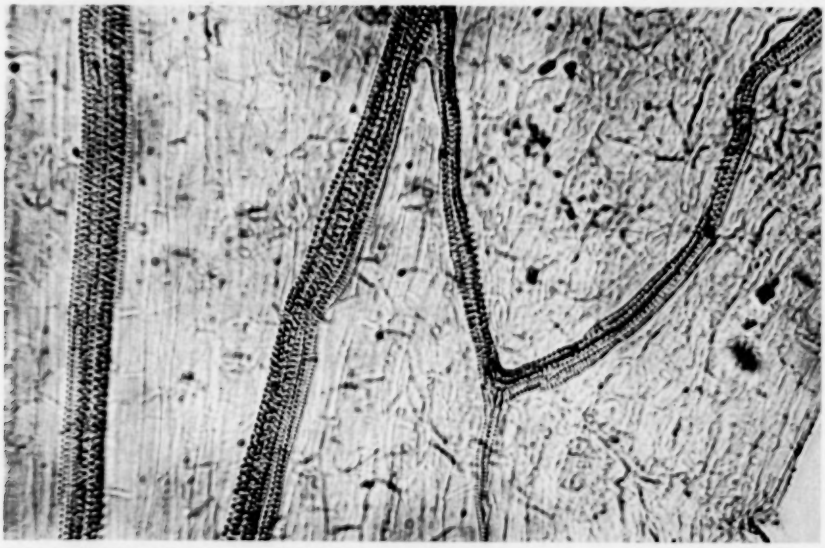


Abb. 17

Abb. 16. Transversaler Längsschnitt durch die Spreitenbasis. Umbiegen eines Procambiumstranges der Basalnervatur von der Hauptlateralen aus. Blattlänge etwa 1,6 mm. Färbung: Tannin-Eisenchlorid-Safranin. 190/1

Abb. 17 u. 18. Aufgehellte Kotyledonen an der Spreitenbasis

Abb. 17. Basaler Anschluß einer Seitenader an das Hauptgefäß durch Schleifenbildung. An der Knickstelle der Schleife zweigt ein zarter Protoxylemstrang basalwärts ab. Blattlänge 8,06 mm. Färbung: Safranin. 156/1

Abb. 18. Basaler Anschluß von α an die Mediane ohne Schleifenbildung. Blattlänge 4,54 mm. Färbung: Safranin. 340/1

Schleifenbildung dargestellt; diese tritt vor allem an der Spreitenbasis häufiger auf, wobei es sich keineswegs um eine anomale Bildung handelt.

Bei den Keimblättern von *Pulsatilla* bestehen fast alle Schleifen aus normalen langen und schmalen Protoxylemzellen, ein Hinweis auf ihren procambialen Ursprung. Nur in ganz wenigen Fällen erfolgte der basale Anschluß *sekundär* durch *Umbildung von Parenchymzellen* in Protoxylem (Abb. 19a). In der Blattspreite kann diese Art der Tracheidenbildung ebenfalls auftreten, um z.B. nachträglich noch zwischen zwei Protoxylemsträngen eine Verbindung herzustellen; dabei können sogar dreieckige Kurztracheiden entstehen (Abb. 19b).

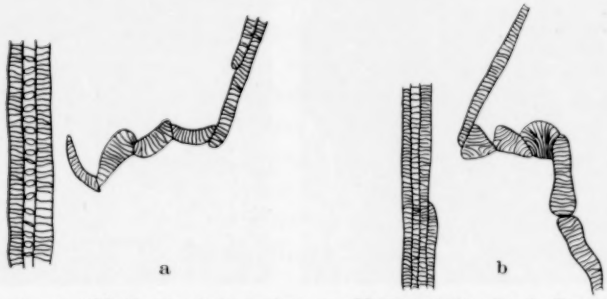


Abb. 19a u. b. Anschluß von Seitenadern an Hauptgefäße durch Tracheidenbrücken (sekundäre Entstehung aus Parenchymzellen). a Basaler Anschluß durch kurze Protoxylemzellen. Blattlänge 4,65 mm. 135/1; b Verbindung zweier Protoxylemstränge durch dreieckige Kurztracheiden. Blattlänge 4,35 mm. 120/1

Die Umbildung normaler Parenchymzellen zu Tracheiden ist vor allem von den Regenerationsprozessen her bekannt. In der normalen Entwicklung ist diese Art der Protoxylembildung allerdings nur selten beobachtet worden (FREUNDLICH 1909, DE SLOOVER 1958).

FREUNDLICH untersuchte den basalen Anschluß der Laterale an die Mediane bei Keimblättern von *Papaver*. Neben procambialen Verbindungen kamen auch (weniger häufig) Tracheidenbrücken vor, deren Protoxylem aus Schwammparenchym hervorgegangen war. Nach FREUNDLICH war in diesem Fall die Längsstreckung der Kotyledonen bereits abgeschlossen, ehe noch die Laterale einen Anschluß an die Mediane in der Spreitenbasis gefunden hatte.

Diese Erklärung trifft für die Keimblätter von *Pulsatilla* nur teilweise zu. Die Tracheidenbrücken mit sekundären Protoxylemzellen (Abb. 19a, b) sind noch im letzten Abschnitt der intraseminalen Phase angelegt worden, als das Längenwachstum vorübergehend zugunsten des Breitenwachstums verringert war. Die eigentliche Längsstreckung der Kotyledonen beginnt jedoch erst nach dem Verlassen der Samenschale.

Bei diesen sekundären Verbindungen (typisches Beispiel Abb. 19a) konnte die Basalader offenbar infolge des Sperreffektes keine procambiale Verbindung mit dem Hauptbündel mehr herstellen, und eine Schleifenbildung war wegen der zu geringen Fläche auch nicht mehr möglich. Eine Mittelstellung nimmt Abb. 18 ein, wobei die Entscheidung, ob

es sich um eine primäre oder sekundäre Verbindung handelt, nicht zu treffen ist. Sollte sie sekundär sein, dann müßten sich die Parenchymzellen mehrfach längsgeteilt haben.

Die Art des basalen Anschlusses, ob primär durch *Schleifen* oder sekundär durch *Tracheidenbrücken*, zeigt, daß die Differenzierung der Basaladern in diesen Fällen basipetal in bezug auf die Gesamtmorphologie des Blattes verlaufen ist. Durch das Umbiegen der Procambiumstränge an der Basis des Keimblattes erhält das sonst acropetal ausgerichtete Adernetzmuster seine besondere Prägung.

D. Diskussion

Das glatte Protoxylem. Anhand von Querschnitten und Totalpräparaten gelang es, in den jüngsten Entwicklungsstadien der Kotyledonen eine bisher fast übersehene Vorstufe des reifen Protoxylems, das glatte Protoxylem, zu finden.

Es ist anzunehmen, daß der Verholzung stets eine *Verdickung der Primärwand* vorausgeht (vgl. Esau 1942). Damit erhebt sich jetzt die Frage, warum dieses Stadium bisher kaum beobachtet wurde. Scott (1937) hat vielleicht den wichtigsten Grund angeführt mit der Vermutung, daß es sich bei dem Vorgang der Verholzung um einen *tagesperiodischen Prozeß* handeln könnte. Die Vorstufen des spiralisierten Protoxylems traten nach Scotts Beobachtungen an rasch wachsenden Internodien von *Ricinus communis* nur um Mitternacht auf, während der Zeitpunkt der aktivsten Verholzung zwischen ein und fünf Uhr nachts lag. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Jacobs und Morrow (1957). Diese Vorstufe ist also zu einer Zeit vorhanden, in der meist keine Fixierung vorgenommen wird.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde das Material stets bei Tage fixiert. Nun ist das glatte Protoxylem bezeichnenderweise aber nur in denjenigen Stadien der Keimblätter von *Pulsatilla* außerordentlich stark verbreitet, die sich noch in der Samenschale und dazu im dunklen Thermostaten befanden. Das ist verständlich, da unter diesen Versuchsbedingungen eine ektogen induzierte, periodische Licht-Dunkel-Reaktion für den Verholzungsvorgang noch gar nicht eingesetzt haben dürfte. Keimblattstadien der intraseminalen Phase sind also vielleicht besonders günstige Objekte für das Studium des glatten Protoxylems.

Durch das Vorhandensein des glatten Protoxylems vor allem in den jüngsten Stadien der Keimblatt-Entwicklung wird aber noch ein anderes Problem aufgeworfen. Während der Keimpflanzenphase treten nämlich häufig sehr alte Züge auf. Nach Zimmermann (1930, S. 383f.) können wir mit einer Wahrscheinlichkeit von 80% von einem besonderen Jugendmerkmal auf ein Ahnenmerkmal schließen.

Es ist demnach möglich, daß das glatte Protoxylem eine solche *primitive Entwicklungsstufe* repräsentiert, in der noch kein Lignin vorhanden ist. Die Verholzung mit Bildung echter Tracheiden tritt im Ablauf der Phylogenie erst bei den Pteridophyten auf. Repräsentanten einer primitiveren Stufe der Gefäßbildung sind nach ZIMMERMANN (1959, S. 106) die Laubmoose; so treten z. B. im Achsenzentrum rezenter *Polytrichaceen* langgestreckte dickwandige Zellen (ligninfreie Hydroiden) auf, die durch Form und Lage den Tracheiden ähneln und die als homogenetisch aufgefaßt werden können.

Die Differenzierungszentren des Protoxylems. Das Hauptzentrum für den Beginn der Protoxylem-Differenzierung in den Keimblättern liegt auch bei *Pulsatilla* in der Blattbasis bei der Abzweigungsstelle der Hauptlateralen von der Mediane. Eine einleuchtende Erklärung dafür stammt von JACOBS und MORROW (1957): sie fanden an dieser Stelle die höchste Konzentration der β-Indolylessigsäure. Nach ihrer Vermutung stellt dieser Bereich für den Transport der IES eine „physiologische Barriere" dar; ein lokales Anwachsen der IES-Konzentration kann genügen, um eine Umwandlung der Procambium- zu Protoxylemzellen zu bewirken.

Für das spiralisierte Protoxylem konnte in den Keimblättern von *Pulsatilla* ein *zweites Differenzierungszentrum* in der *Blattspitze* gefunden werden. Während die anfängliche Entwicklung des Protoxylems acropetal erfolgt, beginnt die Spiralisierung und Reifung der Tracheiden häufig an der Blattspitze und ist dort auch am ehesten abgeschlossen. Diese für andere Gewebe bekannte Tatsache mag in diesem Fall auch mit dem Vorhandensein einer Hydathode an der Blattspitze zusammenhängen. Da die Wasserspalten bald nach Entfaltung des Blattes in Funktion treten, müßten die in der Spitze schon bei jungen Stadien zahlreich vorhandenen Tracheiden auch frühzeitig ausgereift sein. Vielleicht können wir darin einen Hinweis erblicken, daß die Blattspitze neben der Basis als Ausgangspunkt für die Differenzierung auftritt. Überhaupt scheint eine Differenzierung von mehreren Zentren aus für das spiralisierte Protoxylem charakteristisch zu sein.

Das Adernetzmuster. Bei der Untersuchung des Adernetzes tauchte die phylogenetische Frage auf, ob in der Ontogenie der Kotyledonen von *Pulsatilla* Stadien auftreten, die einen *ursprünglichen Nervationstypus* zeigen, wie es die Telomtheorie von ZIMMERMANN annimmt. Die frühen Entwicklungsstufen in der Ontogenie zeigen nun tatsächlich einen nach dem biogenetischen Grundgesetz zu erwartenden Typ einer offenen Nervatur (Abb. 13a).

Im allgemeinen wird die offene dichotome Aderung (vor allem auf Farne und Gymnospermen beschränkt) als primitiv und die geschlossene Nervatur (typisch für Dikotylen) als abgeleitet betrachtet. Nach

ZIMMERMANN (1959, S. 276) tritt im Laufe der Phylogenie die Maschenaderung seit dem Obercarbon auf.

Die Diskussionen von FOSTER, PRAY und TROLL über die Ausbildung der Nervatur in Abhängigkeit vom Wachstum sind noch in vollem Gange. Der Wachstumsablauf hat sich aber als sehr viel komplizierter herausgestellt als man ursprünglich annahm.

Das offene Adernetz im Keimblatt von *Pulsatilla* läßt sich wahrscheinlich auf das im Frühstadium der Ontogenie vorherrschende Spitzen- und Randwachstum zurückführen, während beim Einsetzen des intercalaren Wachstums die Vermaschung der Nervatur beginnt (vgl. PRAY 1960). Diese ist aber unvollkommen: im Vergleich zu den Primär- und Laubblättern stellt das Adernetzmuster des Keimblattes einen einfachen Typ der geschlossenen Nervatur dar, es ist eine *Sonderbildung*.

Vom eigentlichen acropetal ausgerichteten Adernetz unterscheidet sich die *Basalnervatur*, die häufig basipetal in bezug auf das Gesamtblatt angelegt wird. Diese Entwicklung beruht im wesentlichen darauf, daß die Spreitenbasis noch lange meristematisch bleibt. Es können „noch erhebliche Teile der Spreite durch basiplastes Wachstum nachgeliefert werden, besonders auch neue Procambiumstränge zum Aufbau des Nervensystems" (v. GUTTENBERG 1960, S. 278).

Eine solche basipetale Ausgliederung des Procambiums wurde sonst vor allem bei Monokotylen gefunden (s. Einleitung). Innerhalb der Maschen des Adernetzes ist dagegen eine rückläufige Anlegung der Bündel, wie sie z. B. dem Typ der *Venatio Anaxeti* (ZIMMERMANN 1959, S. 277) entspricht, auch bei Dikotylen häufig anzutreffen.

Wenn man unter dem Gesichtswinkel der „Telomtheorie" und des „Biogenetischen Grundgesetzes" die Anatomie der Pulsatilla-Kotyledonen zusammenfassend betrachtet, so fallen eine Reihe von Eigentümlichkeiten auf, die ursprüngliche Merkmale überliefern. Da sind einerseits die zunächst entstehenden „glatten", ligninfreien Tracheiden. Andererseits zeigt auch das Adernetz noch Züge aus einem relativ primitiven Telomsystem, wobei bemerkenswert ist, daß die ersten Entwicklungsstadien des Protoxylems mit seiner „offenen Nervatur" (vgl. Abb. 14a—d) noch fast schematisch ein ursprüngliches Übergipfelungsstadium repräsentieren. Auch die procambiale Anlage des Leitungssystems zeigt die gleiche „offene" Struktur der Blattnerven (Abb. 13a). Weiterhin enden viele Blattnerven vorübergehend oder dauernd blind, und bei einer Vernetzung herrscht die primitive Venatio Goniopteridis vor.

Im Gegensatz dazu sind eine Reihe von Eigentümlichkeiten der Kotyledonen-Anatomie als phylogenetische Sekundärbildungen („Känogenesen") zu bezeichnen. Derartige Sekundärbildungen häufen sich besonders in „Larvenorganen", d. h. bei Organen, die in einem Lebensraum funktionieren, der von dem der adulten Organe abweicht. Auch die

Kotyledonen sind solche „Larvenorgane". Da ist die auf die Blattspitze beschränkte Hydathode, die frühzeitig dort die Ausbildung von Tracheiden veranlaßt. Ähnlich ist auch die relativ kräftige Basalnervatur, die sich ontogenetisch erst sekundär im Zusammenhang mit einer Verbreiterung der basalen Blattfläche entwickelt, eine solche Sonderbildung der Kotyledonen.

Die Untersuchungen über die primäre Bündeldifferenzierung sowie die Ausbildung des Adernetzes bei Keimblättern lassen erkennen, daß bei ihnen, bedingt durch die einfachere Gestaltung, manche entwicklungsgeschichtlichen Probleme leichter zu lösen sind, vor allem dann, wenn neben Mikrotomschnitten auch Totalpräparate verwendet werden. Die Kotyledonen verdienen daher wohl mehr Beachtung in der modernen Forschung, als ihnen bisher zuteil wurde.

Zusammenfassung

1. In der Achse des Embryos differenziert sich das Procambium aus und tritt in *acropetaler* Richtung in die Kotyledonen ein. Die procambialen Stränge sind stets kontinuierlich.

2. Es lassen sich vier Entwicklungsstufen vom Procambium bis zum reifen Protoxylem unterscheiden. Von einer Protoxylemzelle soll erst dann gesprochen werden, wenn die primäre Zellwand verdickt ist, sie also im polarisierten Licht aufleuchtet. Das Protoxylem läßt sich dann in folgende Entwicklungsstadien gliedern:

a) *glattes unreifes Protoxylem* (ohne Sekundärwand),
b) *spiralisiertes unreifes Protoxylem* (mit Zellinhalt),
c) *spiralisiertes reifes Protoxylem* (ohne Zellinhalt).

3. Das glatte Protoxylem stellt ein besonders auffälliges Stadium in den jungen Keimblättern von *Pulsatilla* dar.

4. Der Zeitpunkt des ersten Auftretens dieser drei Protoxylemstadien ist abhängig von der Blattlänge (Schema in Abb. 9). Das glatte Protoxylem differenziert sich kontinuierlich von der Spreitenbasis aus. Die Differenzierung des spiralisierten Protoxylems erfolgt allgemein diskontinuierlich von zwei Zentren: vor allem von der Basis, dann aber auch von der Blattspitze aus (Schema in Abb. 10). Die Reifung des Protoxylems beginnt dagegen in der Spitze des Blattes.

5. Die Entwicklung der Kotyledonen wird in zwei Abschnitte eingeteilt: in der *intraseminalen Phase* steigt die Adernetzdichte (Adernetzlänge/Blattfläche) stark an (bis zu 5,0), später sinkt sie in der *extraseminalen Phase* wieder bis auf 2,0 ab (Kurve in Abb. 11).

6. Zu Beginn des Heraustretens der Kotyledonen aus der Samenschale (Blattlänge etwa 4 mm) sind bereits 24% der Aderlänge angelegt auf nur 12,1 % der Blattfläche (s. Tabelle S. 83).

7. Nur in der Anfangsphase der Entwicklung zeigt das Keimblatt ein *offenes Adernetz* (Abb. 13a). Anastomosen treten im procambialen Netz bei einer Blattlänge von etwa 2 mm auf. Die Anlage des Adernetzes läßt sich durch den Sperreffekt erklären.

8. Die *Basalnervatur* wird häufig basipetal in bezug auf die Gesamtmorphologie des Blattes angelegt. Beim basalen Anschluß an das Hauptbündel können *Schleifen* (procambiale Bildungen) oder *Tracheidenbrücken* (sekundär durch Umbildung aus Parenchymzellen) auftreten.

9. Bei der Nervatur des Keimblattes von *Pulsatilla* handelt es sich um eine Sonderbildung: das Adernetz stellt einen einfachen Typ einer unvollständig gebliebenen geschlossenen Nervatur dar.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die bei der Durchführung unserer Untersuchungen zur Verfügung gestellten Apparate.

Literatur

Auer, S.: Untersuchungen zur Entwicklung der Epidermis an Keimblättern von *Pulsatilla vulgaris*. Manuskript 1960.

Beck, A.: Entwicklung und Bau des Procambiumsystems bei *Pulsatilla*. Diss. Tübingen 1954.

Bünning, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. 3. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953.

Esau, K.: Phloëm anatomy of *tobacco* affected with curly top and mosaic. Hilgardia **13**, 437—470 (1941).

— Vascular differentiation in the vegetative shoot of *Linum*. I. The procambium. Amer. J. Bot. **29**, 738—747 (1942).

— Origin and development of primary vascular tissues in seed plants. Bot. Rev. **9**, 125—206 (1943).

— Plant anatomy. New York and London 1953.

— Primary vascular differentiation in plants. Biol. Rev. **29**, 46—86 (1954).

Foster, A. S.: The use of tannic acid and iron chloride for staining cell walls in meristematic tissue. Stain Technol. **9**, 91—92 (1934).

— Techniques for the study of venation patterns in the leaves of angiosperms. Proc. 7th Intern. Bot. Congr., Stockholm, p. 586—587, 1950.

— Foliar venation in angiosperms from an ontogenetic standpoint. Amer. J. Bot. **39**, 752—766 (1952).

Freundlich, H. F.: Entwicklung und Regeneration von Gefäßbündeln in Blattgebilden. Jb. wiss. Bot. **46**, 137—206 (1909).

Guttenberg, H. v.: Grundzüge der Histogenese höherer Pflanzen. I. Die Angiospermen. In Zimmermann-Ozenda, Handbuch der Pflanzenanatomie, 2. Aufl., Bd. 8, Teil 3. 1960.

Helm, J.: Untersuchungen über die Differenzierung der Sproßscheitelmeristeme von Dikotylen unter besonderer Berücksichtigung des Procambiums. Planta (Berl.) **15**, 105—191 (1931).

Höster, H. R.: Eine Einbettungs- und Färbemethode zur Untersuchung junger pflanzlicher Gewebe. Mikrokosmos **49**, 346—348 (1960).

Jacobs, W. P., and I. B. Morrow: A quantitative study of xylem development in the vegetative shoot apex of *Coleus*. Amer. J. Bot. **44**, 823—842 (1957).

— — Quantitative relations between stages of leaf development and differentiation of sieve tubes . Science **128**, 1084—1085 (1958).

Johansen, D. A.: Plant microtechnique. New York and London 1940.
Miller, H. A., and R. H. Wetmore: Studies in the developmental anatomy of *Phlox Drummondii* Hook. I. The embryo. Amer. J. Bot. **32**, 588—599 (1945a).
— II. The seedling. Amer. J. Bot. **32**, 628—634 (1945b).
Pray, T. R.: Ontogeny of the open dichotomous venation in the pinna of the fern *Nephrolepis*. Amer. J. Bot. **47**, 319—328 (1960).
Rathfelder, O.: Anatomische Untersuchungen an *Pulsatilla* II (Protoxylementwicklung). Flora (Jena) **141**, 379—388 (1954).
— Xylemelemente in polarisiertem Licht. Mikrokosmos **44**, 79—81 (1955).
— Anatomische Untersuchungen an *Pulsatilla* I. Bot. Jb. **77**, 25—51 (1956).
Resch, A.: Beiträge zur Cytologie des Xylems. Planta (Berl.) **45**, 307—324 (1955).
Roelofsen, P. A.: The plant cell-wall. In Zimmermann-Ozenda, Handbuch der Pflanzenanatomie, 2. Aufl., Bd. 3, Teil 4. 1959.
Russow, E.: Vergleichende Untersuchungen... der Leitbündel-Kryptogamen mit Berücksichtigung ... der Phanerogamen. Mem. Acad. Petersbourg, Sér. VII, **19**, 1—207 (1872).
Schuster, W.: Die Blattaderung des Dikotylenblattes und ihre Abhängigkeit von äußeren Einflüssen. Ber. dtsch. bot. Ges. **26**, 194—237 (1908).
Scott, F. M.: Differentation of spiral vessels in *Ricinus communis*. Bot. Gaz. (Chicago) **99**, 69—79 (1937).
— V. Sjaholm and E. Bowler: Light and electron microscope studies of the primary xylem of *Ricinus communis*. Amer. J. Bot. **47**, 162—173 (1960).
Slade, B. F.: The mode of vein-endings in the leaf of *Liriodendron tulipifera* L. New Phytologist **58**, 299—305 (1959).
Sloover, J. de: Le sens longitudinal de la differenciation du procambium, du xylème et du phloème chez *Coleus*, *Ligustrum*, *Anagallis* et *Taxus*. Cellule **59**, 55—202 (1958).
Troll, W.: Vergleichende Morphologie der höheren Pflanzen, Bd. I, Teil 2, S. 1044 bis 1094. Berlin: Bornträger 1938.
Zimmermann, W.: Genetische Untersuchungen an *Pulsatilla* IV. Die Entwicklung des *Pulsatilla*-Blattes als Grundlage für die Blattgenetik. Flora (Jena) **133**, 417—492 (1939).
— Die Phylogenie der Pflanzen, 1. Aufl. Jena 1930; 2. Aufl. Stuttgart 1959.
— D. Woernle u. L. Warth: Genetische Untersuchungen an *Pulsatilla* V. Die Entwicklung von Haaren und Spaltöffnungen bei *Pulsatilla*. Z. Bot. **41**, 227 bis 246 (1953).

Hans-Rolf Höster,
Bremen-Nord, Georg-Gleistein-Str. 22

Planta 56, 97—108 (1961)

Aus dem Botanischen Institut Potsdam-Sanssouci

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS ATMUNGSVERHALTEN DER *HORDEUM*-KOLEOPTILEN NACH KÄLTEBEHANDLUNG DER KARYOPSEN*

Von

W. R. Müller-Stoll und H. Augsten

(Eingegangen am 26. September 1960)

1. Einleitung

Zahlreiche Befunde der letzten Jahre machen eine Beziehung zwischen Vernalisation und Atmung wahrscheinlich, wobei es sich entweder um einen direkten Zusammenhang, d. h. um eine Beteiligung der Atmung am Zustandekommen des Vernalisationszustandes, oder um ein indirektes Verhältnis zwischen Atmung und Vernalisation handeln kann. Die Vernalisation ist sauerstoffabhängig und wird in bestimmten Fällen durch lösliche Kohlenhydrate beschleunigt (Gregory u. Purvis 1938a, b; Purvis 1944, 1947; Filippenko 1940), durch Atmungsinhibitoren dagegen gehemmt (Chouard u. Poignant 1951 u. a.). Auch zahlreiche andere Befunde, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, können in dem Sinne gedeutet werden, daß zwischen Atmung und Vernalisation bestimmte Beziehungen bestehen (vgl. Hänsel 1953; Napp-Zinn 1954, 1957; Sisakjan u. Filippovič 1951, 1953; Sokolova u. Savelieva 1956; Uzami 1956 u. a.).

Die aus kältebehandeltem Saatgut hervorgehenden Getreidekeimlinge unterscheiden sich physiologisch recht erheblich von den unbehandelten Kontrollen (Augsten 1956 u. a.), so daß das durch Vernalisation veränderte Atmungsgeschehen auch an den Koleoptilen untersucht werden kann. Wir bestimmten die Sauerstoffaufnahme isolierter Koleoptilcylinder von 3 und 5 Tage alten *Hordeum*-Keimlingen, die sich aus kältebehandelten Karyopsen entwickelt hatten, und verglichen damit gleichartige, jedoch nicht vorbehandelte Keimlinge. Im gleichen Zusammenhang wurde ferner der Einfluß einer Glucosefütterung und einiger Atmungseffektoren (Malonsäure, Äthylurethan, Kaliumcyanid, 2,4-Dinitrophenol) verfolgt.

2. Material und Methode

Als Versuchsmaterial diente *Hordeum vulgare*, Sommergerste „Haisa", da über die physiologischen Reaktionen dieser Getreidesorte auf Kältebehandlung bereits Erfahrungen in unserem Institut vorliegen (Augsten 1956). Die Kältebehandlung des schwach angequollenen Getreides erfolgte während 30 Tagen bei + 2 bis 4° C; jede aus 50 g lufttrockenen Karyopsen bestehende Probe erhielt anfangs 6 ml und

* Hermann v. Guttenberg zum 80. Geburtstag gewidmet.

während der Kältebehandlung mehrmals in gewissen Zeitabständen 2,5 ml Aqua dest. (insgesamt 21 ml). Um morphologisch vergleichbare, d. h. gleich weit entwickelte Versuchs- und Kontrollkeimlinge zur Verfügung zu haben, wurden die Kontrollkörner jeweils 6—8 Std früher zur Keimung ausgelegt. Diese erfolgte in Petrischalen auf feuchtem Filtrierpapier im Dunkelthermostaten bei 25° C. Von den 3 bzw. 5 Tage alten Keimlingen wurden nach sorgfältiger Auswahl nur gleich weit entwickelte Exemplare verwendet, d. h. es wurden für jeden Versuch aus der Kälte- und zugehörigen Kontrollserie Keimlinge mit genau gleich langem Keimsproß ausgelesen. Dieser hatte bei den 3-Tage-Pflanzen eine Länge von etwa 3, bei den 5-Tage-Pflanzen von etwa 10 cm. Von den hiervon isolierten Koleoptilen wurde in Anlehnung an Bonner (1933) die 3 mm lange Spitze verworfen und der folgende, genau 1 cm lange Abschnitt nach vorsichtiger Entfernung des Primärblattes für die Atmungsmessungen benutzt.

Es wurde mit der Warburg-Methode bei 30° C im Dunkeln gearbeitet. Jedes Gefäß enthielt in Anlehnung an Bonner (1948) 2 ml 0,05 mol KH_2PO_4-Pufferlösung und wurde mit 10 Koleoptilcylindern beschickt. Vor Beginn der Messungen wurde 15 Std bei 25° C im Dunkelthermostaten verarmt. Bei den Versuchen mit Zucker- oder Inhibitorzusatz bestimmten wir zunächst während 2 Std die Grundatmung. Die Substanzen wurden dann in 0,5 ml Puffer gelöst, zugegeben; die Vergleichsgefäße erhielten die gleiche Menge reine Pufferlösung. Nach erneuter Temperatureinstellung (30 min) wurden die Messungen fortgesetzt. Die Konzentrationsangaben in den Tabellen beziehen sich immer auf die Endkonzentration in den Atmungsgefäßen. War eine Zugabe von KCN vorgesehen, so wurde zur CO_2-Absorption statt 10%iger nur 2%ige KOH (0,2 ml) verwendet. Während der Messungen, meist in 30 min-Intervallen, änderte sich der p_H-Wert der Lösungen im allgemeinen nicht nennenswert. Nach Bonner (1936) bleibt die Atmungsintensität isolierter Koleoptilcylinder innerhalb eines weiten p_H-Bereiches praktisch unbeeinflußt. Die statistische Sicherung der Ergebnisse erfolgte nach dem Pätauschen t-Test.

Die Zuckerbestimmungen wurden nach dem Verfahren von Hagedorn-Jensen durchgeführt; die Herstellung der Extrakte und die Hydrolyse zur Erfassung der Disaccharide erfolgte nach Lehmann (1931).

3. Die Sauerstoffaufnahme der Koleoptilen

In Berücksichtigung des Umstandes, daß wegen der durch Vernalisation bewirkten zeitlichen Verschiebung des gesamten Entwicklungsablaufes der Pflanzen die Einrichtung eines einwandfreien Kontrollversuchs schwierig ist, wählten wir die Stückzahl als Bezugsbasis für die Atmungsmessungen. Wir meinen, daß durch Vergleich gleich großer Organteile von Pflanzen gleichen äußeren Entwicklungszustandes die durch Vernalisation bewirkten physiologischen Veränderungen am besten zu beurteilen sind. Bei Verwendung einer anderen Bezugsgröße kann sich das Bild unter Umständen stark verschieben. Die Wahl der Stückzahl als Bezugsbasis empfahl sich außerdem wegen des geringen Gewichtes der Koleoptilcylinder, denn schon kleine Wägefehler können das Ergebnis stark verfälschen. Wir verweisen z. B. auf Bonner (1933, 1936), Kelly u. Avery (1949), Anker (1953), welche bei Versuchen über Koleoptilatmung ebenso verfuhren.

Obwohl mit der Atmungsmessung erst 15 Std nach der Präparation der Koleoptilcylinder begonnen wurde, war die Sauerstoffaufnahme noch

recht intensiv; dasselbe ist auch bei *Avena*-Koleoptilen der Fall (Bonner 1933, 1936, 1948; Kelly u. Avery 1949 u. a.). Die Atmungsintensität schwankte jedoch zum Teil beträchtlich, und zwar nicht nur bei zeitlich auseinanderliegenden Versuchsreihen, sondern auch innerhalb der gleichen Versuchsansätze (vgl. auch Anker 1953, Busse u. Kandler 1956 u. a.). Für dieses nicht einheitliche Verhalten der verarmten Koleoptilen sind Wundatmungseffekte oder verschiedene Gehalte an Atmungssubstrat sicher nicht von Bedeutung; eher spielen hierbei gewisse, der Beobachtung entgehende Entwicklungs-, Größen- oder Dickenunterschiede der Keimlinge bzw. Koleoptilen eine Rolle (vgl. Anker 1953 u. a.). Trotz der beträchtlichen Unregelmäßigkeiten im Atmungsverhalten der Koleoptilsegmente ergab sich eindeutig eine geringere Sauerstoffaufnahme bei den kältebehandelten Objekten (Tabelle 1). Die etiolierten Koleoptilen der 5 Tage alten Keimlinge atmeten schwächer als diejenigen der 3 Tage alten, was auch bei *Avena* schon mehrfach festgestellt wurde (Bonner 1936, Bottelier 1939 u. a.). Die Atmungsdepression nach vorausgegangener Kälteeinwirkung war zwar bei den zahlreichen, von uns durchgeführten Versuchsreihen in ihrem absoluten Betrag recht verschieden, in den allermeisten Fällen aber deutlich ausgeprägt.

Tabelle 1. *Atmungsintensität der Koleoptilen von 3 und 5 Tage alten Keimlingen ohne Kühlung (K) und nach 20tägiger Kältebehandlung der Karyopsen (V)*
Mittelwerte aus jeweils 30—36 Versuchen in mm^3 O_2/Std, bezogen auf 10 Koleoptilsegmente. Sicherung der Differenz K—V durchweg sehr gut ($P<0{,}0027$).

Keimlingsalter in Tagen	Meßintervall in Std	Kontrolle unbehandelt (K)	Kältebehandlung (V)	V in % von K
3	0—2	37,7	32,6	86
	2—4	35,5	30,7	87
	4—6	31,9	28,6	90
	6—8	31,6	27,1	86
				87
5	0—2	26,1	20,7	79
	2—4	23,5	19,0	81
	4—6	22,4	18,4	82
	6—8	21,7	16,9	78
				80

Mit jeweils 50 Koleoptilstücken durchgeführte Bestimmungen ergaben, daß nach Kältebehandlung Frischgewicht, Wassergehalt und Trockengewicht gleich langer Segmente etwas niedriger sind als bei den Kontrollen (Tabelle 2). Die Trockensubstanzgehalte, bezogen auf Frischgewicht — 6,8% bei den Dreitage-, 5,55% bei den Fünftagekeimlingen —, stimmen dagegen überein. Offensichtlich macht sich die Beschleunigung und Abkürzung der Entwicklung durch die Vernalisation bereits bei den Keimlingsgeweben bemerkbar; dafür spricht auch, daß zwischen dem 3. und 5. Tag die Gewichte der Koleoptilsegmente bei den Kälteobjekten stärker absinken als bei den Kontrollen. Die schon bei den 3 Tage alten Koleoptilstücken andeutungsweise vorhandenen, jedoch statistisch nicht

Tabelle 2. *Frischgewicht, Wasser-, Trockensubstanz- und Zuckergehalt 1 cm langer, etiolierter Koleoptilcylinder von kältebehandelten (V) und Kontrollkeimlingen (K) gleichen Entwicklungszustandes*

Mittelwerte aus jeweils 6 Bestimmungen mit 50 Koleoptilstücken, ausgedrückt in mg je Koleoptilcylinder; in Klammer statistische Sicherung der Differenzen (*P*-Werte).

		Frisch-gewicht mg	Wasser-gehalt mg	Trocken-gewicht mg	Zuckergehalt (Glucose) frisch mg	Zuckergehalt (Glucose) 15 Std verarmt mg
Keimlinge 3 Tage alt	V	8,96	8,35	0,61	0,202	0,123
	K	9,61 (0,10)	8,96 (0,15)	0,65 (0,22)	0,243 (<0,0027)	0,158 (<0,0027)
Keimlinge 5 Tage alt	V	6,85	6,47	0,38	0,132	0,100
	K	8,26 (<0,0027)	7,80 (<0,0027)	0,46 (<0,0027)	0,159 (<0,0027)	0,119 (0,007)
Abnahme 3.—5. Tag	V	2,11	1,88	0,23	0,070	0,023
	K	1,35	1,16	0,19	0,084	0,039

gesicherten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsreihen sind am 5. Tag merklich größer geworden und lassen sich nunmehr sehr gut sichern. In der gleichen Zeit sinken auch die Gehalte an direkt reduzierenden Zuckern ab; sie sind sowohl vor als auch nach Verarmung bei den Kältekoleoptilen kleiner (Tabelle 2). Disaccharide waren immer nur in sehr geringer Menge nachweisbar.

Aus den Unterschieden in der Beschaffenheit der Koleoptilen geht hervor, daß das Koleoptilgewebe der vorgekühlten Objekte durch einen andersartigen Gesamtzustand ausgezeichnet ist. Die etwas geringere Trockenmasse der Kältekoleoptilen wirkt sich natürlich erniedrigend auf ihre Atmungsintensität aus. Darüber hinaus muß aber auch der Atmungsmechanismus als solcher verändert sein, denn bei Berechnung der Atmungswerte auf die Trockensubstanz unter Zugrundelegung der in Tabelle 2 mitgeteilten Durchschnittswerte bleibt das Atmungsniveau der Kälteobjekte immer noch niedriger, besonders bei den Koleoptilen der 3 Tage alten Keimlinge. Durch Atmungsmessungen mit 20 Koleoptilsegmenten pro Gefäß (Manometerablesung in 15 min-Intervallen) und Berechnung der Werte auf das Trockengewicht wurde dieses Ergebnis bestätigt. Eine schwächere Atmung nach Kältebehandlung, bezogen auf Trockengewicht, wurde auch bei früheren Versuchen mit Koleoptilen und Primärblättern der gleichen Getreidesorte gefunden (Augsten 1956).

Die veränderten Gewichts- und Zuckerwerte lassen auf eine raschere physiologische Alterung des Koleoptilgewebes der vernalisierten Keimlinge schließen. Damit steht die Mitteilung von Purvis u. Hatcher (1959) in Einklang, daß nach Vernalisation des Saatgutes die Getreidekoleoptilen kürzer bleiben. Nach Albaum, Kaiser u. Eichel (1940)

haben niedrige Quellungstemperaturen (9° C) bei *Avena* ein beschleunigtes Koleoptilwachstum, aber eine geringere Endlänge der Koleoptilen zur Folge. Petrucci (1949) fand bei vernalisierten Weizenkeimlingen eine verlangsamte Trockensubstanzbildung.

4. Einfluß von Zucker auf die Koleoptilatmung

Es ist bekannt, daß bereits normale, besonders aber verarmte Getreidekoleoptilen auf Kohlenhydratzufuhr häufig mit einem starken Atmungsanstieg reagieren. Es war daher von Interesse, ob die von uns festgestellten Atmungsunterschiede zwischen kältebehandelten und nicht kältebehandelten Koleoptilcylindern durch zusätzliches Angebot an Atmungssubstrat ausgeglichen werden. Nach Zusatz von 1% Glucose steigt die Sauerstoffaufnahme der Objekte beträchtlich an (Tabelle 3). Dieser Effekt trat sowohl bei den kältebehandelten wie auch bei den Kontrollen ein. Die Kältekoleoptilen erfuhren dabei eine stärkere Atmungsförderung als die Kontrollen, so daß die Depression der Sauerstoffaufnahme gegenüber den Kontrollen etwas geringer wurde. Doch blieben die Atmungswerte der Kälteobjekte immer noch deutlich unter den entsprechenden Kontrollen. Durch geringere Glucosemengen (0,1, 0,01, 0,001%) wurde die Atmung der Koleoptilen kaum oder nicht beeinflußt. Damit ist auch gezeigt, daß die geringen Unterschiede im Zuckergehalt zwischen den beiden Behandlungsreihen (vgl. Tabelle 2) keinen wesentlichen Einfluß auf die Atmungsintensität der Objekte haben können.

Tabelle 3. *Atmungsintensität der verarmten Koleoptilcylinder unter dem Einfluß von 1% Glucose in mm³ O_2/Std, bezogen auf 10 Koleoptilsegmente*
Mittelwerte aus 2 oder 3 Versuchsreihen mit je 10 Manometergefäßen.

Keimlingsalter in Tagen	Intervall in Std nach Glucosezusatz	Kontrolle			Kältebehandlung			V in % von K	
		K_g mit Glucose	K_o ohne Glucose	K_g in % von K_o	V_g mit Glucose	V_o ohne Glucose	V_g in % von V_o	V_g/K_g mit Glucose	V_o/K_o ohne Glucose
3	0—2	52,9	41,9	126	49,4	33,8	146	93	81
	2—4	60,7	42,8	142	55,0	34,3	160	91	80
	4—6	66,5	37,7	176	57,3	27,9	205	86	74
5	0—2	41,7	24,1	173	36,0	20,1	179	86	83
	2—4	44,4	23,4	190	37,1	16,9	220	84	72
	4—6	48,9	22,9	214	40,9	16,8	243	84	73

Die an *Hordeum*-Koleoptilen ermittelten Ergebnisse stimmen mit bereits vorliegenden Literaturangaben, die sich allerdings ausnahmslos auf das Verhalten der *Avena*-Koleoptile ohne vorausgehende Kältebehandlung beziehen, gut überein (Bottelier 1939, Bonner 1948, Kelly u. Avery 1949, Anker 1953 u. a.). Offenbar ist aber die Reaktion von Koleoptilen auf Zuckerfütterung stark von den jeweiligen Versuchsbedingungen und sonstigen Umständen abhängig, denn verschiedentlich wird in der Literatur über keine nennenswerte oder nur eine schwache Wirkung auf die Atmung berichtet (Bonner 1936, 1949; Kelly 1947 u. a.).

5. Versuche mit Atmungs-Effektoren

Malonsäure wird als kompetitiver Inhibitor der Succinodehydrogenase betrachtet, obwohl, wie wir heute wissen, keine absolute Spezifität vorliegt. Im vorliegenden Fall hatte die Malonsäure in niederer Konzentration (10^{-4} bis 10^{-5}) auf die Koleoptilatmung beider Reihen einen schwach stimulierenden oder keinen Einfluß, in höherer Konzentration trat dagegen eine starke Hemmung der Sauerstoffaufnahme ein (Tabelle 4). Die schwächere Atmung der kältebehandelten Objekte blieb

Tabelle 4. *Einfluß von Malonsäure auf die Atmungsintensität der Koleoptilcylinder bei p_H 4,5*

Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchsserien mit 10 Warburggefäßen in mm^3 O_2/Std, bezogen auf 10 Koleoptilsegmente.

Keimlingsalter in Tagen	Konz. mol	Intervall in Std nach Inhibitorzusatz	Kontrolle			Kältebehandlung			V in % von K	
			K_1 mit Malonsäure	K_o ohne Malonsäure	K_1 in % von K_o	V_1 mit Malonsäure	V_o ohne Malonsäure	V_1 in % von V_o	V_1/K_1 mit Malonsäure	V_o/K_o ohne Malonsäure
3	10^{-2}	0—2	5,9	37,5	16	4,1	29,3	14	69	78
	10^{-3}	2—4	12,3	29,8	41	11,4	28,4	40	93	95
	10^{-4}	4—6	31,2	30,5	102	28,5	27,5	104	91	90
	10^{-5}	4—6	28,7	30,9	93	26,7	26,9	99	93	87
5	10^{-2}	0—2	3,5	29,2	12	3,0	18,6	16	86	64
	10^{-3}	2—4	9,7	28,2	34	9,1	16,8	54	94	60
	10^{-4}	4—6	26,0	23,3	112	19,7	15,8	125	76	68
	10^{-5}	4—6	23,6	25,8	91	19,0	20,0	95	80	78

auch unter Malonsäureeinfluß erhalten. Doch war bei den 5 Tage alten Kältekoleoptilen die Senkung der Atmungsintensität durch 10^{-3} mol Malonsäure deutlich geringer als bei den Kontrollen. Dieser Befund steht mit den Angaben von Sisakjan u. Filippovič (1953) in Einklang, wonach bei Winter- und Sommergerste während der Kältebehandlung die Aktivität der Succinodehydrogenase abnimmt und diejenige der Citronensäure- und Äpfelsäuredehydrogenase ansteigt. Obwohl die Succinodehydrogenase in Koleoptilextrakten noch nicht direkt erfaßt werden konnte, lassen doch verschiedene Befunde auf ihre Anwesenheit schließen (Kelly 1947, Bonner 1948, Kelly u. Avery 1949).

Äthylurethan ist als allgemeiner Inhibitor der Dehydrogenasen bekannt und wirkt im Vergleich mit Phenylurethan erst in höherer Konzentration allgemein zellschädigend. Im vorliegenden Fall hatte dieser Stoff auch in der Konzentration 10^{-1} auf die Sauerstoffaufnahme keine deutliche Hemmwirkung (Tabelle 5). Die schwächere Atmung der Kälteobjekte blieb auch unter dem Einfluß des Urethans erhalten. Während bei den 3 Tage alten Keimlingen keine unterschiedliche Reaktion der Kontroll- und Kältereihe zu erkennen war, ergab sich im Alter von

Tabelle 5. *Einfluß von Äthylurethan, KCN und 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die Atmungsintensität der Koleoptilcylinder bei* p_H *4,5*

Mittelwerte aus jeweils 2—3 Versuchsreihen mit 10 Warburggefäßen für die 2.—4. Std nach Inhibitorzusatz in mm^3 O_2/Std, bezogen auf 10 Koleoptilsegmente.

Inhibitor	Keimlingsalter in Tagen	Konz. mol	Kontrolle			Kältebehandlung			V in % von K	
			K_i mit Inhibitor	K_o ohne Inhibitor	K_i in % von K_o	V_i mit Inhibitor	V_o ohne Inhibitor	V_i in % von V_o	V_i/K_i mit Inhibitor	V_o/K_o ohne Inhibitor
Urethan	3	10^{-1}	36,4	37,7	96	26,3	26,6	99	72	70
		10^{-2}	34,8	38,2	91	28,4	30,1	94	82	79
	5	10^{-1}	29,0	26,4	110	15,2	16,0	95	52	61
		10^{-2}	27,9	26,6	105	17,9	18,8	95	64	71
KCN	3	10^{-1}	3,4	38,4	9	2,2	34,4	6	65	90
		10^{-2}	19,3	41,4	47	17,0	27,3	62	88	66
		10^{-3}	30,3	31,4	96	26,3	27,6	95	87	88
		10^{-4}	35,2	37,7	93	29,1	29,1	100	83	77
	5	10^{-1}	2,8	22,0	13	2,6	17,1	15	93	78
		10^{-2}	10,0	28,0	36	8,8	16,4	54	88	59
		10^{-3}	22,5	23,4	96	16,8	19,8	85	75	85
		10^{-4}	27,6	27,3	101	18,5	18,5	100	67	68
DNP	3	10^{-4}	3,0	37,5	8	2,5	33,3	8	83	89
		10^{-5}	49,2	35,2	140	33,6	30,6	110	68	87
		10^{-6}	35,1	35,7	98	30,8	29,9	103	88	84

5 Tagen bei den Kontrollen eine geringe Stimulation, bei den Kälteobjekten dagegen eine schwache Hemmung der Atmung. Es besteht insofern Übereinstimmung mit den Ergebnissen mit Malonsäure, als erst bei den 5 Tage alten Keimlingen merkliche Unterschiede in der prozentualen Atmungsbeeinflussung zwischen Kontrollen und Kälteobjekten hervortraten. Es ist möglich, daß dieses auf einer sich in diesem Stadium vollziehenden Umstellung im Bereich der dehydrierenden Fermente beruht, welche bei den Kälteobjekten in anderer Weise vor sich geht als bei den unbehandelten Kontrollen.

Macht (1948) beobachtete bei *Lupinus*-Wurzeln nach 24stündiger Kältebehandlung (5,5° C) eine verschiedenartige Wachstumsbeeinflussung durch Äthylurethan gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Die gekühlten Wurzeln wurden durch höhere Urethankonzentrationen viel stärker gehemmt; durch schwache Konzentrationen wurden die Kontrollen etwas stimuliert, wohingegen nach Kältebehandlung noch eine Hemmung bestand. Zu diesem letzten Befund bilden unsere Ergebnisse eine Parallele.

Kaliumcyanid vergiftet den Cytochromoxydasemechanismus, doch ist dieser Hemmeffekt nicht spezifisch, da verschiedene Fermente, darunter auch die Enzyme der Cu-Gruppe, cyanidempfindlich sind. In unserem Fall wurde nur mit relativ hoher KCN-Konzentration eine deutliche Hemmung der Sauerstoffaufnahme erzielt (Tabelle 5). Auch nach Zusatz von Cyanid atmeten die Kältekoleoptilen stets schwächer als die

Kontrollen. Dennoch war die Hemmung in den beiden Reihen im Verhältnis nicht immer gleich groß. Gegenüber 10^{-2} mol KCN erwiesen sich die Kälteobjekte deutlich weniger empfindlich als die nicht gekühlten Kontrollen. Dieser Befund deutet darauf hin, daß durch die Kältebehandlung der Karyopsen eine Veränderung im Endoxydasensystem induziert wird, so daß sich zum mindesten ein quantitativer Unterschied gegenüber den Kontrollen ergibt. In sehr hoher Konzentration (10^{-1} mol) greift das Cyanid sicher nicht mehr spezifisch in den Atmungsmechanismus ein, sondern wirkt allgemein toxisch.

2,4-Dinitrophenol (DNP) ist ein Gift, das den Stoffwechsel tiefgreifend beeinflußt und auch in pflanzlichen Systemen besonders die oxydative Phosphorylierung unterdrückt. Wie Tabelle 5 zeigt, hatte 10^{-4} mol DNP eine extreme Atmungshemmung zur Folge; durch die Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-6} wurde dagegen die Sauerstoffaufnahme stimuliert oder blieb unbeeinflußt. Auch unter DNP-Einfluß atmeten die vorgekühlten Koleoptilen schwächer. Die Reaktion der Kontroll- und Kälteserie war jedoch nicht völlig gleich. Die Stimulation der Atmung durch 10^{-5} mol DNP ist bei den Kontrollen deutlich größer als bei den schwächer reagierenden Kältekoleoptilen, was auf gewisse Unterschiede im Energiehaushalt der gekühlten Objekte hinweist.

6. Besprechung der Ergebnisse

Die isolierten Koleoptilcylinder von *Hordeum vulgare* weisen in ihrem Atmungsverhalten zu den schon häufig untersuchten *Avena*-Koleoptilen zahlreiche Parallelen auf; dieses gilt auch für die Wirkung einer Zuckerfütterung der verarmten Koleoptilen. Aber auch hinsichtlich der Wirkungsweise der von uns verwendeten Atmungseffektoren besteht weitgehende Übereinstimmung mit den bei *Avena*-Koleoptilen gemachten Erfahrungen, die sich allerdings nur auf nicht kältebehandeltes Material beziehen. Da jene Befunde mit den hier interessierenden Fragen nicht in unmittelbarem Zusammenhang stehen, sei auf eine weitere Erörterung verzichtet.

Bemerkenswert ist, daß die verarmten Koleoptilcylinder von Keimlingen aus kältebehandeltem Saatgut eine im Vergleich mit den Kontrollen deutlich erniedrigte Atmungsintensität aufweisen. Da nach früheren Beobachtungen (Augsten 1956) die ganzen Keimlinge nach Kältebehandlung und Dunkelkultur einen höheren Zuckergehalt besitzen, war bei den *Hordeum*-Koleoptilen ein ähnliches Ergebnis zu erwarten. Die Koleoptilen der vorgekühlten Keimlinge sind aber deutlich zuckerärmer; außerdem besitzen gleich lange Koleoptilstücke nach Vorkühlung etwas weniger Trockensubstanz (Tabelle 2). Dennoch ist die schwächere Atmung nach Kältebehandlung nicht nachweisbar substratbedingt. Vielmehr ist der Atmungsmechanismus der Koleoptilen als

solcher durch die vorausgegangene Kältebehandlung verändert worden; dafür spricht z. B. die Tatsache, daß bei Glucosefütterung das Atmungsniveau der Kältekoleoptilen trotz gleich hohen Zuckerangebotes immer mehr oder weniger unter demjenigen der Kontrollen bleibt (Tabelle 3).

Die Atmungsdepression bei den oberirdischen Keimlingsorganen nach Kältebehandlung des Saatgutes ist kein Sonderfall. Beispielsweise konnten wir bei Zugrundelegung von Trockensubstanz oder Stückzahl den gleichen Effekt auch dann beobachten, wenn das Primärblatt aus dem Koleoptilcylinder nicht entfernt oder die Atmungsintensität des Primärblattes allein gemessen wurde (Augsten 1956). Mit unseren Befunden übereinstimmende Ergebnisse erhielt Petrucci (1949) an Winter- und Sommerweizen (Sorte „Virgilio" bzw. „Fanfulla"), indem die vorgekühlten Keimlinge im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen zunächst ebenfalls eine geringere Atmungsintensität aufwiesen; später wurde allerdings das Atmungsniveau gegenüber den Kontrollen erhöht. Die Überschneidung der Atmungskurven trat bei Sommerweizen später ein als bei Winterweizen. In unserem Institut mit verschiedenen Objekten durchgeführte, noch unveröffentlichte Untersuchungen ergaben mehrfach, daß die Atmung nach Vorbehandlung mit tiefen Temperaturen erniedrigt ist, später aber das Niveau der Kontrollen übersteigt; offenbar sind dabei mehrere Faktoren von Einfluß (Artzugehörigkeit, Beschaffenheit und Alter der mit Kälte behandelten Objekte, Kühlungsdauer). Andererseits vertritt Met (1950) auf Grund von Versuchen mit Winterweizen, Sorte „Vilmorin 1929", die Auffassung, daß eine Kältebehandlung keine deutliche Veränderung der Atmungsintensität zur Folge hat. Er fand zwar bei den vorgekühlten Objekten (Keimung bei 2° C) teilweise eine geringere Atmung als bei den Kontrollen, führt diese Unterschiede jedoch auf ungleichen Entwicklungszustand der Objekte zurück. Nach Bagdykov (1954) und Rubin u. Sokolova (1954) sollen Jungpflanzen von vernalisiertem Winterweizen stärker atmen als solche von nicht vernalisiertem Winter- und Sommerweizen. Nach den in einer späteren Arbeit enthaltenen Angaben (Sokolova u. Savelieva 1956) sind jedoch die diesbezüglichen Feststellungen keineswegs eindeutig.

Die bisherigen Befunde machen wahrscheinlich, daß der Atmungsmechanismus der Pflanze durch die Kältebehandlung bestimmte Veränderungen erfährt. Die von uns mit Koleoptilcylindern unter Verwendung verschiedener Inhibitoren durchgeführten Versuche deuten darauf hin, daß einige an der Atmung beteiligte Enzymsysteme durch tiefe Temperaturen zum mindesten quantitative Verschiebungen (Senkung der Fermentaktivität) erfahren. Wenn auch unter dem Einfluß der verwendeten Atmungseffektoren die Sauerstoffaufnahme bei den kältebehandelten Objekten in allen Fällen geringer als bei den entsprechenden Kontrollen blieb, waren doch z. T. deutliche Unterschiede

in der prozentualen Hemmung oder Stimulation zu beobachten. Sisakjan u. Filippovič (1951, 1953) gelangten auf Grund ihrer Untersuchungen an verschiedenen Sommer- und Wintergetreiden zu dem allgemeinen Ergebnis, daß die Cytochromoxydase während der Vernalisation durch die Ascorbinsäureoxydase ersetzt wird und daß auch innerhalb der Dehydrasensysteme wesentliche Aktivitätsverschiebungen eintreten, wohingegen die Peroxydase mit dem Vernalisationsprozeß in keinem Zusammenhang stehen soll.

Mit diesen Befunden sind unsere Ergebnisse nur schwer vergleichbar. Einmal liegt den zitierten Arbeiten eine andere Versuchsmethodik zugrunde, z. B. Aktivitätsbestimmungen in Extrakten, ferner fehlt meist der Bezug auf einen Kontrollversuch; denn ein solcher ist in exakter Form bei der Untersuchung kaltgelagerter, gequollener Karyopsen aus methodischen Gründen nicht durchführbar (Augsten 1956); leider wird dadurch die Erfassung der kältebedingten Erscheinungen erschwert. Immerhin können wir feststellen, daß unsere Befunde die zitierten Autoren insofern bestätigen, als wir im Bereich der Dehydrogenasen und Endoxydasen Anzeichen kälteinduzierter Veränderungen beobachten konnten. Wir glauben allerdings, daß sie in der Größenordnung nicht an die von den russischen Forschern angegebenen Enzymverschiebungen heranreichen. Genauere Aussagen darüber werden sich erst nach weiteren, eingehenden Studien machen lassen. Auch bei Untersuchungen von Uzami (1956) mit Winterweizen unter Verwendung von Atmungseffektoren wurden Veränderungen der Terminaloxydation durch Vernalisation gefunden; es wird angenommen, daß das Cytochromsystem vielleicht durch Polyphenoloxydasen ersetzt wird; Ascorbinsäureoxydase konnte nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu gelangt Günther (1959) zu der Auffassung, daß die von Sisakjan u. Filippovič (sowie Uzami) festgestellten Aktivitätsänderungen der Endoxydasen durch die schon während der Kältebehandlung einsetzenden Keimungsvorgänge bedingt sind; eine Umschaltung der Oxydationssysteme infolge spezifischer Kältewirkung soll nicht stattfinden. Allerdings werden Veränderungen im Bereich der Endoxydation nicht nur für gekühlte Karyopsen und junge Keimlinge, sondern auch für ältere vernalisierte Getreidepflanzen angegeben (Sokolova u. Savelieva 1956, Teltscherová 1960).

Zusammenfassung

1. Die Sauerstoffaufnahme der Koleoptilcylinder von *Hordeum vulgare* (Sommergerste Haisa) ist nach 30tägiger Kältebehandlung der Karyopsen bei +2 bis 4° C gegenüber unbehandelten Kontrollkoleoptilen von gleichem Entwicklungszustand herabgesetzt. Koleoptilstücke gleicher Länge von 3 und noch mehr von 5 Tage alten Keimlingen sind nach Vorkühlung etwas ärmer an Trockensubstanz und Zucker.

2. Durch Fütterung der verarmten Koleoptilcylinder mit 1% Glucose wird die Atmung der kältebehandelten Objekte prozentual stärker erhöht als diejenige der Kontrollen; das Atmungsniveau bleibt aber auch dann noch unter demjenigen der Kontrollen.

3. Malonsäure, Äthylurethan, Kaliumcyanid und 2,4-Dinitrophenol beeinflussen die Atmungsintensität der vorgekühlten und nicht gekühlten Koleoptilen weitgehend in gleichem Sinne. Unterschiede in der prozentualen Hemmung und Förderung zwischen den gekühlten Objekten und den Kontrollen weisen auf gewisse, durch die Kältebehandlung induzierte Veränderungen im Bereich der Dehydrogenasen und der Terminaloxydation der Atmung hin.

Der technischen Assistentin, Frau Helga Karsten danken wir für die zuverlässige Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Literatur

Albaum, H. G., S. Kaiser and B. Eichel: Coleoptile growth after preliminary soaking of oat grains in various solutions. Amer. J. Bot. **27**, 619 (1940).

Anker, L.: The effect of indole acetic acid and other growth promoting substances on the endogenous respiration of the *Avena* coleoptile. Acta bot. neerl. **2**, 22 (1953).

Augsten, H.: Fermentaktivität und Atmung bei Sommergerste nach Kältebehandlung des Saatgutes. Dtsch. Akad. Landwirtschaftswiss., Wiss. Abh. **20** (1956).

Bagdykov, N. I.: Die Atmungsintensität von Sommer- und Winterweizen im Zusammenhang mit der Entwicklung der Pflanzen. [Russisch.] Izv. Akad. Nauk SSSR., Ser. Biol. **1954**, H. 6, 3.

Bonner, J.: The action of the plant growth hormone. J. gen. Physiol. **17**, 63 (1933).

— The growth and respiration of the *Avena* coleoptile. J. gen. Physiol. **20**, 1 (1936).

— Biochemical mechanism in the respiration of the *Avena* coleoptile. Arch. Biochem. **17**, 311 (1948).

— Relations of respiration and growth in the *Avena* coleoptile. Amer. J. Bot. **36**, 429 (1949).

Bottelier, H. P.: On factors affecting the respiration of the *Avena* coleoptile. Rec. Trav. bot. néerl. **36**, 658 (1939).

Busse, M., u. O. Kandler: Über die Wirkungen der β-Indolylessigsäure auf den Stoffwechsel von *Avena*-Koleoptilen. Planta (Berl.) **46**, 619 (1956).

Chouard, P., et P. Poignant: Recherches préliminaires sur la vernalisation en présence d'inhibiteurs de germination et de respiration. C. R. Acad. Sci. (Paris) **232**, 103 (1951).

Filippenko, I. A.: Entwicklungshemmung bei vernalisierten Pflanzen, die unter zeitweisem Sauerstoffmangel litten. [Russisch.] Dokl. Akad. Nauk SSSR. **28**, 167 (1940).

Gregory, F. G., and O. N. Purvis: Studies in vernalisation of cereals. II. The vernalisation of excised mature embryos, and of developing ears. Ann. Bot., N. s. **2**, 237 (1938a). — III. The use of anaerobic conditions in the analysis of the vernalising effect of low temperature during germination. Ann. Bot., N. s. **2**, 753 (1938b).

Günther, G.: Untersuchungen über die Aktivität der Endoxydasen im Verlauf einer Kältebehandlung von Sommer- und Winterweizenkaryopsen. Ber. dtsch. bot. Ges. **72**, (25) (1959).

Hänsel, H.: Vernalisation (Jarovisation, Kältestimmung). Z. Pflanzenzücht. **32**, 233 (1953).

Kelly, S.: The relationship between respiration and water uptake in the oat coleoptile. Amer. J. Bot. **34**, 521 (1947).

—, and G. S. Avery jr.: The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other physiologically active substances on respiration. Amer. J. Bot. **36**, 421 (1949).

Lehmann, O.: Die quantitative Erfassung kleinster Mengen biologisch wichtiger Zuckerarten unter Ausschluß reduzierender nicht kohlenhydratartiger Körper. Planta (Berl.) **13**, 575 (1931).

Macht, D. I.: Phytopharmacological experiments with urethane. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **67**, 237 (1948).

Met, M.: Étude de la respiration du blé au cours d'une germination normale et pendant le traitement de vernalisation. Rev. gén. Bot. **57**, 429 (1950).

Napp-Zinn, K.: Vergleichende Atmungsmessungen an Sommer- und Winterannuellen. Untersuchungen an Caryopsen und Embryonen von *Secale cereale* und an Samen von *Arabidopsis thaliana*. Z. Naturforsch. **9b**, 218 (1954).

— Physiologische Analyse des Vernalisationsvorganges. (Besprechung.) Z. Bot. **45**, 320 (1957).

Petrucci, D.: Ricerche sull'azione della vernalizzazione nel metabolismo del „*Triticum vulgare*". Atti Accad. naz. Lincei, Ser. VIII **6**, 742 (1949).

Purvis, O. N.: Studies in the vernalisation of cereals. VIII. The role of carbohydrate and nitrogen supply in the vernalisation of excised embryos of Petkus winter rye. Ann. Bot., N.s. **8**, 285 (1944). — X. The effect of depletion of carbohydrates on the growth and vernalisation response of excised embryos. Ann. Bot., N. s. **11**, 269 (1947).

—, and E. S. J. Hatcher: Some morphological responses of cereal seedlings to vernalisation. J. exp. Bot. **10**, 277 (1959).

Rubin, B. A., u. V. E. Sokolova: Besonderheiten der Reaktionsfähigkeit der Atmung auf die Temperatur bei Winter- und Sommerweizen. [Russisch.] Izv. Akad. Nauk SSSR., Ser. Biol. **1954**, H. 1, 20.

Sisakjan, N. M., u. I. I. Filippovič: Über den Charakter der Veränderungen der Aktivität der Atmungsfermente im Prozeß der Stadienentwicklung der Pflanzen. [Russisch.] Dokl. Akad. Nauk SSSR., N. s. **76**, 443 (1951).

— — Der Charakter des Stoffwechsels bei der Stufenentwicklung des Organismus. [Russisch.] Ž. obšč. Biol. **14**, 215 (1953).

Sokolova, V. E., u. O. N. Savelieva: Besonderheiten der oxydierenden Fermente in Winter- und Sommerweizen. [Russisch.] Dokl. Akad. Nauk SSSR. **111**, 165 (1956).

Teltscherová, L.: Einige Charakteristiken des Metabolismus des Vegetationskegels des Weizens unter Berücksichtigung der Umweltbedingungen. (Vortrag.) Symposium über Entwicklungsphysiologie Prag, Sept. 1960.

Uzami, S.: Über die biochemischen Veränderungen in den Weizensamen in den Stadien der Vernalisation. [Russisch.] Izv. Akad. Nauk SSSR., Ser. Biol. **1956**, H. 5, 97.

Prof. Dr. W. R. Müller-Stoll,
Dr. H. Augsten,
Potsdam-Sanssouci, Maulbeerallee 1—2,
Botanisches Institut der Pädagogischen Hochschule Potsdam

Planta 56, 109—124 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Aachen

NEUE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE STRUKTUR DER PARTIELLEN WANDVERDICKUNGEN VON FASERFÖRMIGEN KOLLENCHYMZELLEN*

Von

ALPHONS TH. CZAJA

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. Oktober 1960)

Einleitung

In seiner Abhandlung „Die mechanischen Elemente und das mechanische System" (Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. IV, Teil 6, S. 7, 1957) schreibt TOBLER: „Die Kollenchymzellen weisen keine Tüpfel auf, soweit man nicht bei weitgehender Eckenverdickung und Einschränkung der dünnbleibenden Wandstellen nach der Nachbarzelle hin, diese Stellen etwa als geradlinige Längstüpfel ansehen will." HABERLANDT hat dagegen in seiner „Physiologischen Pflanzenanatomie" erwähnt, daß die prosenchymatischen Kollenchymzellen meist spaltenförmige, longitudinal gestellte Tüpfel besitzen (1924, 6. Aufl., S. 146). Bei der Nachprüfung dieser Frage an verschiedenen Pflanzen ergaben sich außer der Klarstellung der Frage nach den Tüpfeln neue Einzelheiten über den Feinbau dieses eigenartigen Festigungsgewebes, über welche nachfolgend berichtet werden soll.

AMBRONN (1881) hatte das Fehlen von Verholzung der Kollenchymzellen, besonders aber deren mechanische Festigkeit nachgewiesen. DE BARY (1877) und GILTAY (1882) untersuchten besonders das hohe Quellungsvermögen und die Schrumpfung bei Wasserentzug. Die geringe Doppelbrechung der Kollenchymverdickungen auf dem Querschnitt wurde von MÜLLER (1890) festgestellt sowie eine Klassifizierung verschiedener Typen dieses Gewebes gegeben. COHN (1892) untersuchte das Wasseraufnahmevermögen dieser Zellen quantitativ. Die schon von GILTAY beobachtete auffällige Schichtung der kollenchymatischen Verdickungen des Eckenkollenchyms wurde erst von ANDERSON (1927) näher untersucht. Am Eckenkollenchym von *Solanum lycopersicum* (Stengel) wurde festgestellt, daß die Eckenverdickungen auf dem Querschnitt deutliche blättrige Struktur besitzen und aus Lamellen bestehen, welche abwechselnd aus Pektinstoffen und Cellulose aufgebaut sind. Bei Behandlung isolierter einzelner Kollenchymfasern mit Jodjodkalium und Schwefelsäure gelingt es bei anfangs leichtem, später verstärktem

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. HERMANN VON GUTTENBERG zum 80. Geburtstage gewidmet.

Druck auf das Deckglas, die in den Kollenchymecken verlaufenden Lamellen (bis zu 20) ganz voneinander zu trennen und diese auf dem Objektträger flach auszubreiten. An diesen Lamellen waren keine weiteren spiraligen oder sonstigen Strukturen zu sehen, obwohl Anzeichen darauf hindeuteten, „daß möglicherweise eine steile submikroskopische Struktur vorhanden ist". MAJUMDAR u. PRESTON (1941) bestätigen, daß im Kollenchym von *Heracleum sphondylium* die lokalen Wandverdickungen aus einer Anzahl von Lamellen bestehen (gewöhnlich 4—7), welche rundum in der Zellwand verlaufen, wobei cellulosereiche und pektinarme und cellulosearme und pektinreiche miteinander abwechseln. Die innerste Schicht ist frei von Pektin. Die Celluloseketten verlaufen nahezu in der Längsrichtung mit einer Winkelstreuung von $\pm 14^{0}$. Diese Zellwandschicht ist stärker doppelbrechend als die vorher angelegten Schichten. Das rührt nach den Verff. daher, daß in diesen der Streuungswinkel der Celluloseketten erheblich kleiner ist als in der innersten Schicht. In den inneren Wandschichten besitzen die Celluloseketten eine bemerkenswerte konstante Orientierung parallel der Längsachse der Zelle (lange Achse!). Diese ist nach ihrer Meinung zurückzuführen auf einen orientierenden Mechanismus in der Plasmaoberfläche, welcher durch die Zellstreckung betätigt wird. Wahrscheinlich ist die unterschiedliche Orientierung in den früheren Lamellen darauf zurückzuführen, daß die Zellwand eine sehr erhebliche Streckung erfahren hat. Diese und mehrere spätere Untersuchungen (ANDERSON u. MOORE 1937; MAJUMDAR 1941; PRESTON u. DUCKWORTH 1946, sowie BEER u. SETTERFIELD 1958) beziehen sich auf die Strukturierung der Kollenchymzellen und der Verdickungen, welche der Querschnitt erkennen läßt.

Material und Methoden

Zu den Untersuchungen wurde das schon anfangs benutzte Ausgangsmaterial, die Blattstiele von *Beta vulgaris* L. (Runkelrübe), als sehr geeignetes Objekt verwendet, sodann die Stengel von *Solanum lycopersicum*, die Stengel bzw. Blattstiele von *Heracleum sphondylium* (MAJUMDAR u. PRESTON 1941), Blattstiele von *Rheum undulatum*, sowie zahlreiche andere von den verschiedenen Kollenchymtypen (MÜLLER 1890). Eine Übersicht der untersuchten Pflanzen befindet sich auf S. 119.

Die Untersuchungen wurden ausgeführt an Handschnitten, sowie an mazeriertem Material, frischem und in Alkohol konserviertem. Für die Maceration hat sich neben solcher in Pikrinsäure u.a. etwa $^{1}/_{2}$stündiges Kochen in Wasser bei weichen Objekten sehr bewährt.

Eigene Untersuchungen

Die Tüpfel der Kollenchymfasern

Bei Prüfung von Dünnschnitten und von isolierten Kollenchymfasern im gewöhnlichen Licht sind keine Tüpfel zu erkennen. Darauf sind zweifellos die zitierten Angaben zurückzuführen, bzw. das Stillschweigen, mit dem fast durchweg diese Frage, z. B. in den Lehrbüchern, übergangen

wird. In den Abbildungen von Kollenchymfasern sind nirgendwo Tüpfel eingezeichnet. Aber wie frühere Untersuchungen (CZAJA 1958) schon gezeigt haben, brauchen auch im gewöhnlichen Licht optisch leer erscheinende Zellwände keineswegs frei von besonderen Strukturen zu sein (z. B. von Tüpfeln und Tüpfelfeldern). An sehr dünnen Längsschnitten durch die Kollenchymschicht, z. B. des Tomatenstengels, und besonders an den Enden schräg angeschnittener und auskeilender Zellen erkennt man im polarisierten Licht zwischen gekreuzten Polarisatoren, wenn sich die Längsachse der Faserzellen in Orthogonallage befindet (z. B. 90—270°), bzw. unter benachbarten Azimuten, in den unverdickten Wandteilen schräg orientierte dunkle parallele, schmalelliptische Zonen, welche sich von der matt erscheinenden übrigen Zellwand deutlich abheben. Diese Zonen sind dünnere und abweichend texturierte Wandstellen. Werden entsprechende Längsschnitte in Jodjodkalium-Lösung eingelegt und vorsichtig vom Rand des Deckglases aus mit konz. Zinkchloridlösung beschickt, so färbt sich die Zellwand hellblau, in dem unverdickten Teil noch heller. Darin bleiben dann die eben beschriebenen schrägen schlitzförmigen Stellen ungefärbt. Zwischen gekreuzten Polarisatoren werden diese noch deutlicher. Damit ist das Vorhandensein von schräg gestellten schlitzförmigen Tüpfeln in der Wandung der Kollenchymzellen bewiesen.

Da die Behandlung der empfindlichen Längsschnitte durch die häufig nur schmale Kollenchymschicht mit Chlorzinkjodlösung die Untersuchung auf Tüpfel sehr erschwert, läßt sich der Nachweis auch an nur aufgehellten Längsschnitten führen. Die Untersuchung erfolgt zwischen gekreuzten Polarisatoren. Wenn die Längsachse der faserförmigen Zellen mit einer der Orthogonallagen zusammenfällt, dann erscheinen in den schon völlig ausgelöschten unverdickten Wandstreifen der Faserzellen in etwa regelmäßigen Abständen kleine (negative) Polarisationskreuze an den Stellen der Tüpfel, auch zwei bis drei schräg nebeneinander. Das Auftreten der Kreuze beruht darauf, daß die Mikrofibrillen tangential um die Tüpfel orientiert sind (cf. CZAJA 1958, S. 335). In Abb. 1 ist auf diese Weise die Darstellung der Tüpfel in den Kollenchymzellen des Blattpolsters von *Angiopteris evecta* wiedergegeben. Wenn die Längsachse der Zellen fast in Richtung der Orthogonallage eingestellt wird, löschen die Verdickungsleisten weitgehend aus, so daß die schwachen Polarisationskreuze über den Tüpfeln genügend hell erscheinen. In entsprechender Weise wurden die Tüpfel z. B. in den Kollenchymfasern von Stengeln bzw. Blattstielen von *Beta vulgaris*, *Rheum undulatum*, *Solanum lycopersicum*, *Begonia rex*, *Heracleum sphondylium*, *Lappa major*, *Sambucus nigra*, *Helianthus annuus* und vielen anderen nachgewiesen, welche in den folgenden Untersuchungen aufgeführt werden.

Diese schräge Anordnung der Tüpfel läßt auf schräge (spiralige) Texturierung wenigstens der äußeren Schichten der Wandung schließen.

MAJUMDAR u. PRESTON (1941) haben schon bemerkt, daß die Außenschicht („outer layer") der Kollenchymfasern von *Heracleum sphondylium* spiralig verquillt. In Abb. 2 ist eine isolierte Kollenchymfaser

Abb. 1. *Angiopteris evecta*, schräg auslaufender Längsschnitt durch das Kollenchym des Blattstielpolsters zwischen gekreuzten Polarisatoren. In den unverdickten Wandteilen Reihen von Tüpfeln, kenntlich durch die (negativen) Polarisationskreuze. (Vergr. 160 : 1*)

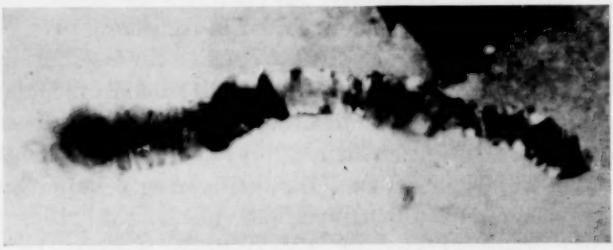


Abb. 2. *Petasites officinalis*, isolierte Kollenchymfaser aus dem Blattstiel mit Jod-Schwefelsäure spiralig verquollen. (Vergr. 16:1)

aus dem Blattstiel von *Petasites officinalis* mit Jod-Schwefelsäure spiralig verquollen.

Dafür spricht auch der Dichroismus, welchen besonders die schräg angeschnittenen Enden dieser Zellen erkennen lassen. Bei Chlorzinkjodreaktion zeigen diese die tiefste Violettfärbung, wenn die Richtung der spaltenförmigen Tüpfel mit der Schwingungsrichtung eines allein verwendeten Polarisationsfilters zusammenfällt, während bei Verlauf senkrecht dazu merkliche Aufhellung erfolgt.

* Die Vergrößerungsmaßstäbe beziehen sich auf die Original-Aufnahmen. Alle Abbildungen wurden 3fach nachvergrößert.

Untersuchung der Kollenchymfasern

Die oben geschilderten Untersuchungen der faserförmigen Kollenchymzellen in Dünnschnitten und als isolierte Fasern an lebendem und

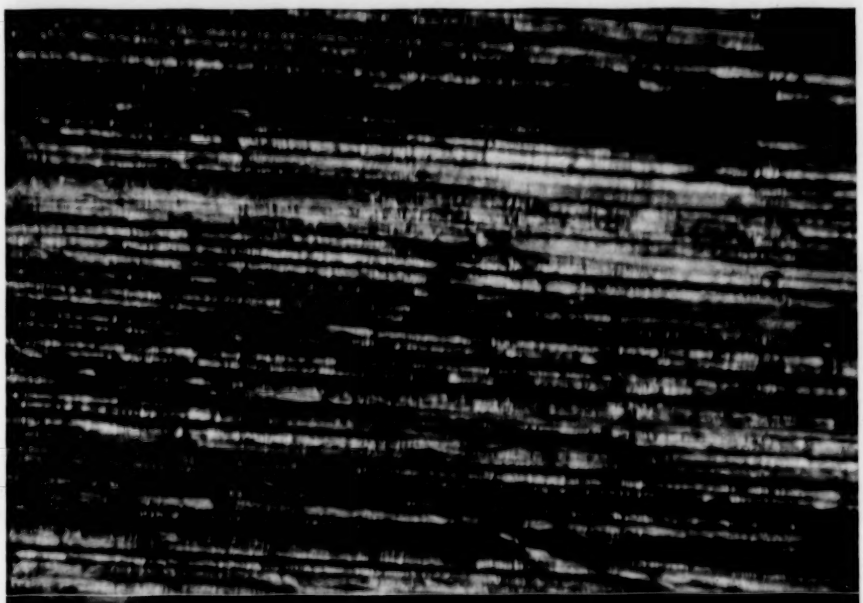


Abb. 3

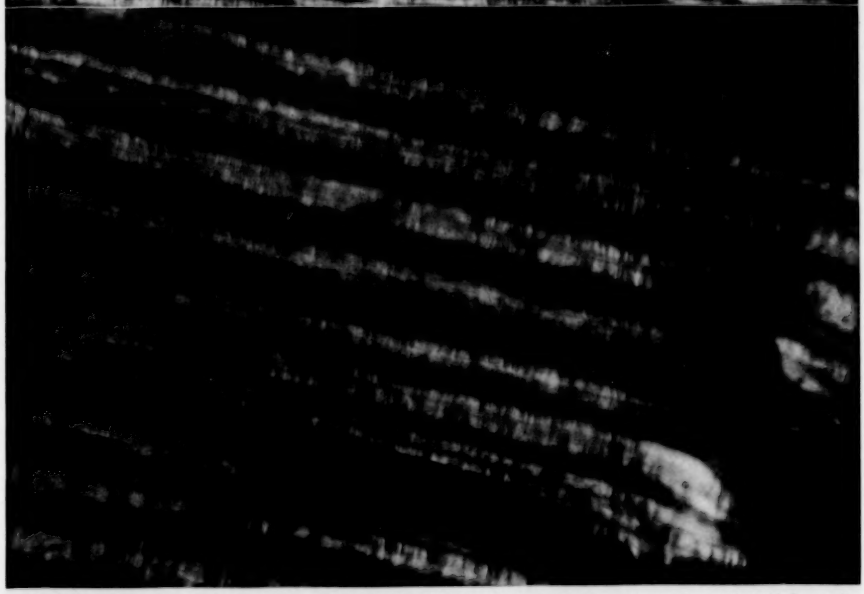


Abb. 4

Abb. 3. *Beta vulgaris.* Radialer Längsschnitt durch das Kollenchym des Blattstiels mit zahlreichen Fasern gekreuzte Polarisatoren. (Vergr. 16 : 1)

Abb. 4. Wie Abb. 3. (Vergr. 64 : 1)

Alkoholmaterial zwischen gekreuzten Polarisatoren in und um die Orthogonallage haben weiterhin die überraschende Feststellung gebracht, daß

Abb. 5. Wie Abb. 2, Einzelheiten des Wandbaues, Faserenden. (Vergr. 160:1)

Abb. 6

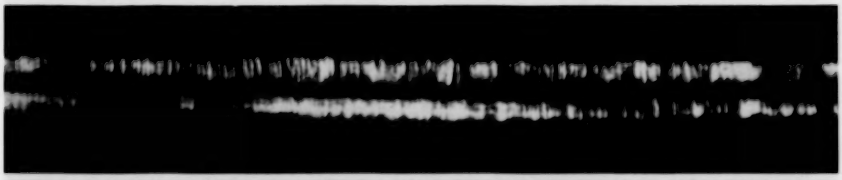


Abb. 7

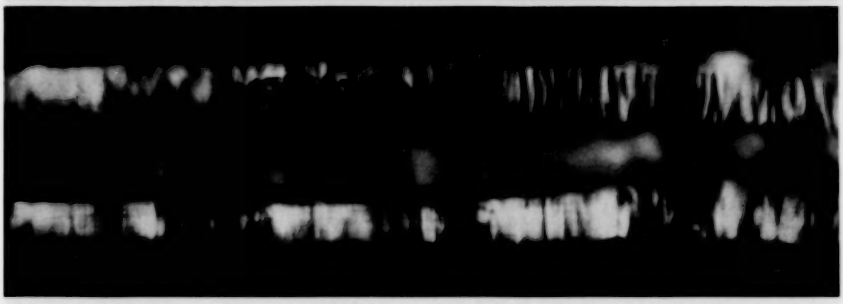


Abb. 6. *Beta vulgaris*, Teil einer Kollenchymfaser durch Kochen isoliert. (Vergr. 160:1)
Abb. 7. *Rheum undulatum*, Teil einer Kollenchymfaser durch Kochen isoliert. (Verg. 320:1)

die Längsleisten in den Zellen, welche in den Diagonallagen stark aufhellen, in den Orthogonallagen zwar auslöschen, wenn die Schnitte bei schwacher Vergrößerung betrachtet werden. Wird die Untersuchung dagegen bei 160—320facher Vergrößerung vorgenommen, so erkennt

man, daß während des Auslöschens in der Nähe der Orthogonallagen, die Kontinuität der Membranleisten aufhört und einer feinen Querstreifung Platz macht. Sehr feine noch helle und schon völlig dunkle Querzonen wechseln miteinander regelmäßig ab. In den Orthogonallagen erscheinen dann die Leisten völlig dunkel, um bei weiterer Drehung wieder quergestreift aufzuhellen. Die Querstreifung verschwindet bei abermalig fortgesetzter Drehung sehr rasch infolge der starken Aufhellung der hellen Querstreifen. Die Erscheinung wird besonders deutlich, je geringer die Dicke der Schnitte ist, besonders an deren Enden und wenn es sich um isolierte Fasern handelt. Dreht man die Faserzellen aus der Orthogonallage bzw. diesen eng benachbarten, wieder in die Diagonallage, so verschwindet die Querstreifung sehr rasch infolge der Überstrahlung durch die aufhellenden Querschichten. Diese ist an gewöhnlichen Schnitten überhaupt nicht zu erkennen, auch nicht zwischen gekreuzten Polarisatoren oder nur gelegentlich und andeutungsweise, besonders, wenn man diese schon vorher gesehen hat. Im gewöhnlichen Licht entzieht sie sich der Beobachtung vollständig. Das mag auch der Grund sein, weshalb diese Querstreifung bisher völlig übersehen worden ist. In Abb. 3 u. 4 ist bei Vergrößerungen 16:1 und 64:1 je ein Längsschnitt durch das Kollenchym des Blattstieles der Runkelrübe dargestellt nach den oben gegebenen Bedingungen. Weitere Einzelheiten des Zellwandbaues sowie Faserenden sind in Abb. 5 dargestellt. Die Abb. 6 zeigt ein Stück einer isolierten Faser aus dem Blattstiel der Runkelrübe, Abb. 7 ein solches aus dem Blattstiel des Gemüse-Rhabarbers.

Es wurde nun zunächst geprüft, ob die Erscheinung der Querstreifung der Verdickungsleisten des Kollenchyms allgemein verbreitet ist, oder ob es sich hier nur um ein Einzelvorkommen oder gar um eine Täuschung gehandelt hat. Die in der Aufstellung auf S. 119 genannten Pflanzen wurden auf die Struktur der Kollenchymzellen untersucht. Es hat sich dabei gezeigt, daß die oben beschriebene Erscheinung der Querstreifung der Leisten in den Kollenchymfasern, ganz gleich, ob es sich dabei um Ecken-, Platten-, Lücken- oder Bastkollenchym handelt, allgemein für Kollenchymzellen charakteristisch ist.

Versuche zur optischen und mikrochemischen Differenzierung der Querlamellen

Nach den vorliegenden Ergebnissen der Untersuchungen an den Verdickungen der faserförmigen Kollenchymzellen lag die Vermutung nahe, daß die abwechselnd hellen und dunklen Querstreifen ebenfalls aus Cellulose bzw. Pektin bestehen könnten. Daher wurde versucht, den Nachweis zu führen, daß auf Längsschnitten, welche besonders dünn und achsenparallel orientiert waren, die Querstreifen der Kollenchymleisten abwechselnd aus Cellulose und Pektin bestehen. Das gelingt mit der

Chlorzinkjod-Reaktion, wenn sich die Leisten etwa in Diagonallage befinden, am besten, wenn diese mit einer der Schwingungsrichtungen einen Winkel von etwa 23° bilden. Bei Benutzung des Photomikroskops „Pol" von Zeiss mit zentriertem Drehtisch und Polarisatoren läßt man den Analysator, welcher schiebbar ist, eingeschaltet. Stellt man den leicht drehbaren Polarisator mit jenem parallel, dann erscheinen die Kollenchymleisten leicht violett gefärbt im hellen Gesichtsfeld. An sehr dünnen Stellen des Schnittes sieht man aber deutlich helle (ungefärbte) und dunkle (gefärbte) Querlamellen miteinander abwechseln. Wenn man nun in den Winkeln bzw. an den Fäden des Fadenkreuzes besonders markante Stellen der Querschichtung fixiert, an denen dunkle (violette) und farblose Schichten sehr deutlich sind und dann langsam den Polarisator dreht (bis sich die Schwingungsrichtungen kreuzen), dann ist deutlich festzustellen, daß die im hellen Gesichtsfeld violettgefärbten Schichten zwischen gekreuzten Polarisatoren gelb aufleuchten (Jodfarbe), während die im hellen Gesichtsfeld auch hellen Schichten zwischen gekreuzten Polarisatoren auslöschen, also dunkel werden.

Dieser Farb- und Helligkeitswechsel der unmittelbar nebeneinanderliegenden Querschichten beruht darauf, daß die im hellen Gesichtsfeld mit Chlorzinkjod gefärbten (violetten) Schichten (Cellulose) zwischen gekreuzten Polarisatoren etwa in Diagonallage infolge der Doppelbrechung aufleuchten, nun aber durch den Jodgehalt gelblich erscheinen. Die im hellen Gesichtsfeld aber ungefärbten (hellen) Querschichten (Pektin reagiert nicht auf Chlorzinkjod) löschen zwischen gekreuzten Polarisatoren völlig aus (werden schwarz), da Pektin nicht doppelbrechend ist.

Mittels der Chlorzinkjod-Reaktion in Kombination mit der Untersuchung im polarisierten Licht bei parallelen und gekreuzten Polarisatoren und dem langsamen Übergang zwischen beiden Orientierungen gelingt es also, an sehr dünnen Längsschnitten bei guter Orientierung die Cellulose- und die Pektinschichten der Kollenchymleisten wechselweise jeweils hell und dunkel nebeneinander hervortreten zu lassen.

Weiterhin wurde versucht, durch Anfärben die verschiedenen Schichten zu charakterisieren. Eine Differenzierung mußte schwierig erscheinen wegen der geringen Dicke und der engen Aufeinanderfolge, da auch hierbei die Möglichkeit der Überstrahlung besteht. Anfärben mit 0,5% Methylenblaulösung ergab hellblaue Gesamtfärbung der Verdickungsleisten, mit 0,1% Rutheniumrotlösung hellrote einheitliche Färbung. Eine Differenzierung war nicht möglich, da bei Betrachtung der Leisten zwischen gekreuzten Polarisatoren kurz vor dem Auslöschen die Celluloseschichten zwar noch schwach aufgehellt, die Pektinschichten dagegen schon völlig dunkel sind.

Zugabe von verdünnter Salzsäure zu den Schnitten läßt die Querstreifung deutlicher werden. An frischen Längsschnitten tritt die Streifung

nicht immer gleich deutlich hervor. Diese wird aber gut sichtbar, sobald die Säure den Schnitt durchdrungen hat. Mit Erhöhung der

Abb. 8

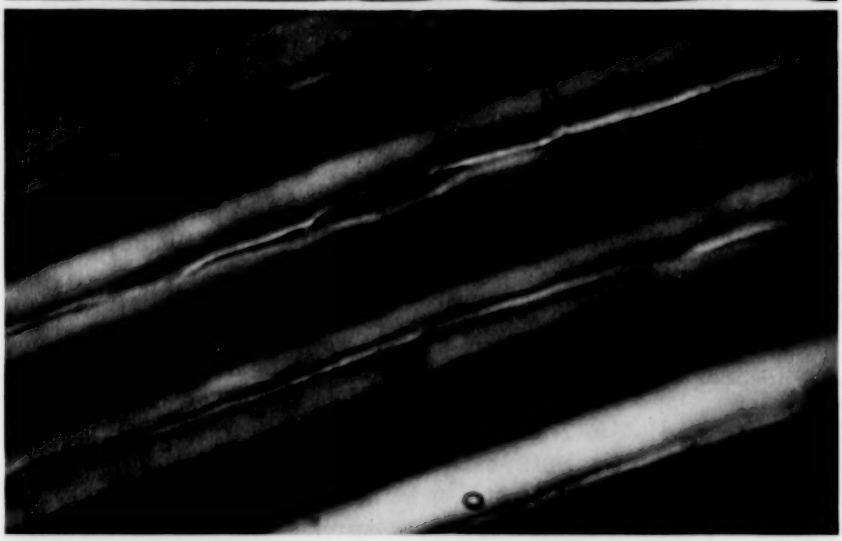


Abb. 9

Abb. 8. *Beta vulgaris*, Blattstiel Längsschnitt. Kollenchymzellen mit verdünnter Salzsäure behandelt. Die Lamellierung der Verdickungsleisten tritt stärker hervor. (Vergr. 160:1)

Abb. 9. Wie Abb. 8, aber mit verdünnter Natronlauge behandelt. Die Pektin-Querlamellen sind geschrumpft, Lamellierung kaum sichtbar. (Vergr. 160:1)

Säurekonzentration quellen die dunklen Querstreifen auf, d. h. das Pektin verquillt und die Celluloseschichten gehen etwas auseinander (Abb. 8). Auf Zugabe von verdünnter Natronlauge ziehen sich die Kollenchym-

leisten etwas zusammen. Die vorher im Wasserpräparat deutlich erkennbare Querstreifung wird mehr und mehr unsichtbar. Infolge von Entquellung schrumpfen die Pektinschichten, die Celluloseschichten rücken näher zusammen, so daß die Querstreifung praktisch verschwindet (Abb. 9). Die Doppelbrechung der Verdickungsleisten insgesamt bleibt bei dieser Behandlungsweise unverändert.

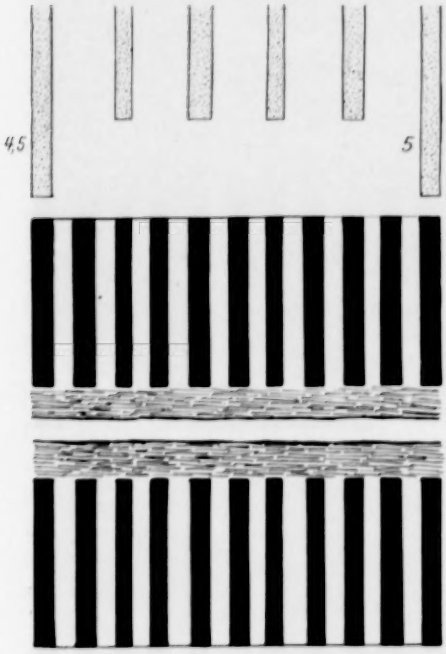


Abb. 10. Schematische Zeichnung. Stück einer Kollenchymzellwand mit Mittellamelle und sekundärer Wandschicht und Querlamellierung, während der Messung gezeichnet nach dem polarisationsmikroskopischen Bild der Vergr. 160:1; oben im Bild die Teilstriche des Objektmikrometers (0,5 Einheiten). Die Teilstriche so dick wie die Lamellen

Bei der Verquellung der Pektinschichten mittels verdünnter Salzsäure werden die Celluloseschichten in den Verdickungsleisten frei und können beim Hantieren mit den Schnitten mehr oder minder stark in Unordnung geraten, d. h. unregelmäßige Lage einnehmen. Man erkennt deutlich, daß es sich um feine Querlamellen aus Cellulose handelt, welche zu beiden Seiten der Mittellamelle angeordnet sind.

Werden die Kollenchymzellen oder einzelne Verdickungsleisten dann in Diagonallage gebracht $+45^0$ und zwischen gekreuzten Polarisatoren mit dem Gipskompensator Rot I. O. betrachtet, so erscheinen die Celluloselamellen im Blau II. O., sie lassen also Addition erkennen. Daraus geht hervor, daß die Cellulosefibrillen *quer* in den feinen Lamellen verlaufen, also in Richtung der Längsachse der Leiste bzw. der Kollenchymfaser. A. FREY (1926) und MAJUMDAR u. PRESTON (1941) hatten schon festgestellt, daß die Leisten in den Kollenchymfasern Paralleltextur besitzen. In der Diagonallage -45^0 zeigen die Querlamellen aus Cellulose entsprechend der Subtraktionslage nun das Gelb I. O. Die Zwischenräume zwischen den Celluloselamellen zeigen in beiden Fällen das Rot I. O. wie der Untergrund.

Die Dicke der Querlamellen

Die Querstreifung der Wandverdickungen ist bei gekreuzten Polarisatoren und schwacher Abweichung der Kollenchymzellen von einer der beiden Orthogonallagen bei Vergrößerung 16:1 noch nicht deutlich

erkennbar, wohl aber bei Vergrößerung 64:1. Da die Querstreifen eine deutliche Dicke besitzen, war es von Interesse, diese zu messen. Die Messung kann nur unter den eben geschilderten optischen Bedingungen erfolgen. Die Messung der Einzellamelle ist nicht möglich, da diese die Strichdicke des Okularmikrometers besitzen. Es gelingt jedoch, an besonders klaren Stellen der Schnitte, z. B. bei Präparaten aus dem Blattstiel von *Beta vulgaris*, etwa 20 Lamellen abzuzählen und diese als Ganzes zu messen. In Abb. 10 ist eine solche Messung schematisch dargestellt unter gleichzeitiger Angabe der relativen Längen und Breiten der Lamellen. Bei Vergrößerung 160:1 wurden 20 Lamellen auf 0,5 Okular-Mikrometer-Einheiten gezählt. Diese 0,5 Einheiten entsprachen 12 μ, d.h. eine Lamelle besitzt demnach eine Breite (Dicke) von 0,6 μ. Diese Abmessung wurde auch bei anderen Objekten gefunden. Im Stengel von *Solanum lycopersicum* waren die Lamellen etwas dicker. Bei der gleichen Vergrößerung wurden nur 11 Lamellen auf der Strecke von 12 μ gezählt, so daß die Einzellamelle eine Dicke von 1,09 μ besitzt.

Die untersuchten Pflanzen

Von den folgenden Pflanzen wurden teils Blattstiele, teils Stengel auf die Struktur der Kollenchymfasern untersucht.

Althaea officinalis L.
Althaea rosea (L.) CAV.
Angiopteris evecta HOFFM.
Apium graveolus L.
Begonia heracleifolia CHAM. et SCHLECHT.
Begonia rex PUTZ.
Beta vulgaris L.
Calendula officinalis L.
Centranthus ruber DC.
Cerinthe minor L.
Chenopodium album L.
Tropaeolum majus L.
Cochlearia armoracia L.
Cucumis sativus L.
Ecballium elaterium A. RICH.
Echinops horridus DESF.
Escholtzia californica CHAM.
Fagopyrum esculentum MOENCH.
Glycine hispida MAXIM.
Helianthus annuus L.
Helleborus niger L.
Clematis vitalba L.
Oenanthe aquatica LMK.
Oenothera biennis L.
Petasites officinalis MOENCH.
Rheum undulatum L.
Ricinus communis L.
Sambucus nigra L.
Sicyos angulatus L.
Solanum lycopersicum L.
Solanum nigrum L.
Solanum tuberosum L.
Sonchus oleraceus L.
Heracleum sphondylium L.
Humulus lupulus L.
Impatiens roelei WALP.
Lappa major GAERTN.
Mercurialis annua L.
Tussilago farfara L.
Tradescantia virginica L.
Typhonium giganteum ENGL.
Zanthedeschia aethiopica SPRENG.

Diskussion

Bei der Untersuchung von Längsschnitten durch die Kollenchymschicht verschiedener Stengelorgane und Blattstiele auf das Vorhandensein von Tüpfeln in den nichtverdickten Wandteilen zwischen gekreuzten Polarisatoren wurde die überraschende Feststellung getroffen, daß die Verdickungsleisten sehr feine Querstreifung bzw. Querlamellierung besitzen. Diese bislang unbekannte Struktur der Kollenchymzellen konnte sich deshalb bis jetzt der Beobachtung entziehen, weil diese im gewöhnlichen Licht nicht sichtbar ist, im polarisierten Licht zwischen gekreuzten Polarisatoren nur dann, wenn die Kollenchymfasern — seit langem als paralleltexturiert bekannt — kurz vor dem völligen Auslöschen in den Orthogonallagen untersucht werden. Wie andere Fasern mit Paralleltextur hellen diese beim Drehen des Objekttisches um 360° viermal auf (Diagonallagen) und löschen viermal aus (Orthogonallagen), wenn diese zwischen gekreuzten Polarisatoren untersucht werden. A. FREY (1926) und PRESTON (MAJUMDAR u. PRESTON 1941) haben das Vorliegen von achsenparalleler Orientierung der Cellulosefibrillen in den Leisten der Kollenchymfasern festgestellt. Bei Vergrößerungen unter 100:1 ist bis etwa 50:1 an den Kollenchymzellwänden nichts Besonderes zu bemerken. Wenn jedoch kurz vor dem Erreichen der Orthogonallagen und dem Auslöschen die Verdickungsleisten über 60:1 vergrößert und beobachtet werden, dann tritt für kurze Zeit die Diskontinuität in Erscheinung. Da die Dicke der einzelnen Lamellen im allgemeinen unter 1 μ liegt und diese abwechselnd aus Cellulose (stark doppelbrechend) und Pektin (isotrop) bestehen, werden die Pektinlamellen im allgemeinen bei der polarisationsmikroskopischen Untersuchung überstrahlt und treten bei nicht allzu dünnen Schnitten überhaupt nicht in Erscheinung. Bei der Vielzahl der Strukturuntersuchungen an den Kollenchymfasern seit 1927 und bei der immer wiederholten Bestätigung, daß Längslamellierung der Verdickungsleisten existiert, war das Vorhandensein einer zusätzlichen Querlamellierung zunächst mit Skepsis aufzunehmen. Die durchgeführte vergleichende Untersuchung einer größeren Anzahl verschiedener Pflanzen unter den Dikotyledonen und Monokotyledonen (nach DE BARY 1877 und nach TSCHIRCH 1889 kommt Kollenchym bei Monokotyledonen nicht vor) und sogar Pteridophyten ergab unterschiedslos die gleichen Feststellungen. Die außerordentliche Regelmäßigkeit in der Anordnung der Querlamellen auch auf Schnitten von größerer Breite und auch in unversehrten Zellen, welche durch Maceration isoliert worden waren, mußte schließlich auch die letzten Zweifel an der realen Existenz dieser Strukturen beseitigen. Die Sicherheit des Vorhandenseins der Querstreifung bzw. Querlamellierung erlaubt endlich, eine einzelne aufgefundene faserförmige Zelle mit partieller Wandverdickung, welche derartige Querstreifung erkennen läßt, als Koll-

enchymzelle zu erklären. Diese Eigentümlichkeit besitzt diagnostischen Wert und ist z. B. für Pharmakognosie, Lebensmittel-Mikroskopie und für forensische Zwecke von Bedeutung. Fernerhin ist diese zur Definition von faserförmigen Kollenchymzellen unerläßlich.

Die Querlamellierung überrascht um so mehr, als die Verdickungsleisten aus Längslamellen zusammengesetzt sind, und kompliziert das Bild der Kollenchymfasern und das Verständnis ihrer funktionellen Bedeutung. Aber vielleicht wird gerade das Verständnis dadurch erleichtert angesichts der Tatsache, daß in den Gelenkpolstern von Leguminosenblättern und in den Grasknoten Kollenchymgewebe vorhanden ist (HABERLANDT, 6. Aufl., 1924) und in den Blattstielpolstern („Gelenkpolster") von *Angiopteris evecta* und anderen Marattiaceen. Bei *Angiopteris evecta* enthält nur das Blattstielpolster Kollenchymfasern, während unmittelbar darüber dieses im Blattstiel durch Sklerenchym ersetzt ist. HABERLANDT betont neben der Wachstumsfähigkeit die Geschmeidigkeit des Kollenchyms als wichtige Eigenschaft dieses Gewebes gerade in den Gelenkpolstern und Grasknoten. Ist an der Existenz der Querlamellen der Kollenchymleisten nicht mehr zu zweifeln, so macht doch das Verständnis der Vereinigung beider Lamellensysteme in diesen Leisten noch einige Schwierigkeiten. Bei der Durchsicht der Literatur ist an 2 Stellen schon eine Andeutung der Querstreifung zu erkennen, wenn auch ungewollt. Es handelt sich bei ANDERSON (1927) um die Abb. 7, Tafel II, Erläuterung: „Verschiedene Stadien der Trennung der Celluloselamellen in isolierten Kollenchymzellen nach Behandlung mit Jodjodkalium und Schwefelsäure. Vergr. 55." Die Abbildung stellt spiralig bis scheibenförmige dunkle Gebilde dar, welche keine Beziehungen zu den sonst abgebildeten Lamellen erkennen lassen. Bei MAJUMDAR u. PRESTON (1941) handelt es sich um die Abb. 10, Tafel 8, mit der Erläuterung: „Macerated collenchyma treated with iodine followed by $ZnCl_2$ (140×)." Die Abbildung zeigt wohl eine isolierte Kollenchymzelle (oder Kollenchymleiste ?), in der Mitte durchzogen von einem hellen Streifen (Lumen oder Mittellamelle ?), während die Zonen zu beiden Seiten fein hell und dunkel genau quer gestreift sind. Das gleiche Bild erhält man, wenn eine Kollenchymleiste mit Chlorzinkjod gefärbt ist und über dem Analysator betrachtet wird. Eine Erklärung dafür wird nicht gegeben.

Es gelang gelegentlich die Beobachtung von beiden Lamellensystemen an der gleichen Kollenchymleiste, wie Abb. 11 von *Rheum undulatum* und *Heracleum sphondylium* und Abb. 12 von *Heracleum sphondylium* zeigen, im letzteren Fall das Ende einer Kollenchymleiste bei Verquellung mit Jod-Schwefelsäure. In diesen Fällen handelt es sich aber um Einzelbeobachtungen. Bei der sehr großen Anzahl von untersuchten Präparaten von sehr verschiedenen Pflanzen war allgemein eine

derartige Überlagerung nicht zu erkennen. Diese Tatsache findet eine Begründung zunächst darin, daß sowohl die Längslamellen normalerweise fest aneinanderhaften, und es bedarf schon starker Quellungs-

Abb. 11. Kollenchymverdickungsleisten mit zwei überlagerten Lamellensystemen. Oben: von *Heracleum sphondylium*, Blattstiel mit Chlorzinkjod-Reaktion (Vergr. 64:1). Unten: von *Rheum undulatum*, gekocht. (Vergr. 160:1)

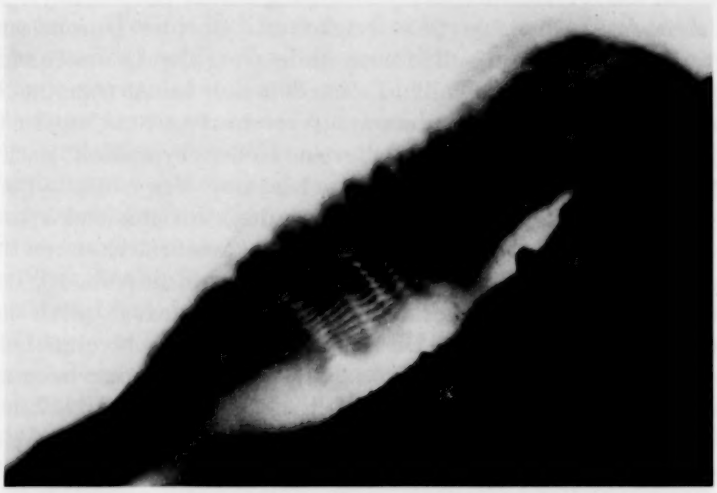


Abb. 12. *Heracleum sphondylium*, Kollenchymfaser aus dem Blattstiel, Chlorzink-Reaktion; Überlagerung der beiden Lamellensysteme. (Vergr. 160:1)

eingriffe (heiße verdünnte Salzsäure, Ammoniak und frisch angesetztes Kupferoxydammoniak), um diese voneinander zu lösen. Es gelang erstmals in den Versuchen von ANDERSON (1927) bei den Längslamellen diese Trennung durchzuführen. In gleicher Weise haften die Querlamellen fest aufeinander. Auch diese lösen sich erst nach stärkeren Eingriffen (mäßig verdünnte Salzsäure) und lassen sich andererseits auch noch

fester miteinander versintern (verdünnte Natronlauge), so daß diese überhaupt nicht mehr in Erscheinung treten.

Wenn sich Vermutungen über die Bedeutung dieser Querschichtung der Kollenchymleisten schon jetzt äußern lassen, so kann es sich dabei nur um eine Weiterführung der Unterteilung der Verdickungsleisten eines Lamellensystems in einer weiteren Dimension handeln. Was die Cellulose-Pektinlamellen (ANDERSON 1927) in der Querrichtung dieses Organells bedeuten, das stellen die oben beschriebenen Cellulose-Pektinlamellen in der Längsrichtung des Organells dar. Es wird durch deren Anwesenheit die Quellfähigkeit der Zellwände des Kollenchyms erhöht, außerdem wohl die von HABERLANDT schon namhaft gemachte Geschmeidigkeit noch verstärkt.

Die Verdickungsleisten der faserförmigen Kollenchymzellen dürfen wegen ihrer schon bekannten Lamellenstruktur und der neu aufgefundenen Querlamellierung in der Längserstreckung (auf die Länge einer Faser von 600 μ im Blattstiel von *Beta vulgaris* entfallen bei 0,6 μ Dicke etwa 1000 Querlamellen) als sehr bemerkenswerte Strukturelemente bezeichnet werden. Es gibt weder für die Längslamellierung noch für die oben beschriebene zusätzliche Querlamellierung von pflanzlichen Zellwänden bzw. Verdickungsleisten abwechselnd aus cellulosereichen und pektinreichen Schichten ein Analogon.

Zusammenfassung einiger Ergebnisse

1. Die nichtverdickten Anteile der Zellwände faserförmiger Kollenchymzellen enthalten entgegen anderen Angaben schräggestellte, schlitzförmige Tüpfel, welche aber bei der üblichen Präparation in durchfallendem gewöhnlichen Licht nicht zu erkennen sind. Im polarisierten Licht mit und ohne Chlorzinkjod-Reaktion sind diese Tüpfel zwischen gekreuzten Polarisatoren leicht zu erkennen.

2. Die Verdickungsleisten der Kollenchymfasern zeigen bei Untersuchung von sehr dünnen Längsschnitten oder isolierter Zellen im polarisierten Licht zwischen gekreuzten Polarisatoren in der Nähe der Orthogonallagen sehr feine Querstreifung bzw. Querlamellierung. Im gewöhnlichen Licht ist diese Querstreifung nicht zu erkennen.

3. Die Querlamellen erscheinen abwechselnd hell (anisotrop) und dunkel (isotrop). In den Diagonallagen hellen die Verdickungsleisten so stark auf, daß die isotropen Schichten völlig überstrahlt werden und die Leisten einheitlich strukturiert erscheinen.

4. Die anisotropen Schichten bestehen vornehmlich aus Cellulose, die isotropen überwiegend aus Pektinstoffen. Durch Behandlung mit verdünnter Salzsäure lassen sich die Pektinlamellen verquellen (die Querlamellierung wird deutlicher), mit verdünnter Natronlauge schrumpfen die Pektinlamellen zusammen (die Schichtung wird undeutlich).

5. Die Dicke der Querlamellen liegt im allgemeinen unter 1 μ.

6. Die Querlamellierung der Verdickungsleisten der Kollenchymfasern wurde bei zahlreichen, daraufhin untersuchten Pflanzen gefunden, so daß diese als allgemeine Eigenschaft der Kollenchymfasern bezeichnet werden kann und für die Definition Bedeutung besitzt.

Literatur

Ambronn, H.: Über die Entwicklungsgeschichte und die mechanischen Eigenschaften des Collenchyms. Jb. wiss. Bot. **12**, 473—541 (1881).

—, u. A. Frey: Das Polarisationsmikroskop. Leipzig 1926.

Anderson, D. B.: Über die Struktur der Kollenchymzellwand auf Grund mikrochemischer Untersuchungen. S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. Abt. I **136**, 429—439 (1927).

Anderson, D. B., and J. H. Moore: The influence of constant light and temperature upon the structure of the walls of cotton fibers and collenchymatous cells. Amer. J. Bot. **24**, 503—507 (1937).

Bary, A. de: Vergleichende Anatomie der Vegetationsorgane der Phanerogamen und Farne. Leipzig 1877.

Beer, M., and G. Setterfield: Fine structure in thickened primary walls of collenchyma cells of celery petioles. Amer. J. Bot. **45**, 571—580 (1958).

Bitter, G.: Marattiaceae. In A. Engler u. K. Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien, Teil I, Abt. 4, S. 422. 1902.

Cohn, J.: Beiträge zur Physiologie des Collenchyms. Inaug.-Diss. Berlin 1892.

Czaja, A. Th.: Untersuchungen über die submikroskopische Struktur der Zellwände von Parenchymzellen in Stengeln und Wurzeln. Planta (Berl.) **51**, 329—377 (1958).

Giltay, E.: Sur le collenchyme. Arch. néerl. **17**, 432 (1882).

Haberlandt, G.: Physiologische Pflanzenanatomie, 6. Aufl. Leipzig 1924.

Kisser, J.: Mazeration parenchymatischer Gewebe bei vollständiger Erhaltung des Zellinhaltes. Planta (Berl.) **2** (1926).

Majumdar, G. P.: The collenchyma of *Heracleum sphondylium* L. Proc. Leeds Phil. Soc. **4**, 25—41 (1941).

—, and E. D. Preston: The fine structure of collenchyma cells in *Heracleum sphondylium* L. Proc. roy. Soc. B **130**, 201—217 (1941).

Müller, C.: Ein Beitrag zur Kenntnis der Formen des Collenchyms. Ber. dtsch. bot. Ges. **8**, 150—166 (1890).

Preston, R. D., and R. B. Duckworth: The fine structure of the walls of collenchyma cells in *Petasites vulgaris* L. Proc. Leeds Phil. Lit. Soc. **4**, 343—351 (1946).

Tobler, Fr.: Die mechanischen Elemente und das mechanische System. In K. Linsbauers Handbuch der Pflanzenanatomie, 2. Aufl., Bd. **4**, Teil 6. 1957.

Tschirch, A.: Angewandte Pflanzenanatomie, Bd. 1, S. 300. 1889.

Wisselingh, C. van: Contribution à la connaissance du collenchyme. Arch. néerl. Sci. exact. natur. **17**, 23—58 (1882).

Prof. Dr. A. Th. Czaja,
Aachen, Botanisches Institut der Technischen Hochschule

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigung bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Vorläufige Mitteilungen werden nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellungen der Tatbestände ist zulässig.

II. Formelle Anforderungen

Originalarbeiten sollen nicht umfangreicher als zwei Druckbogen (à 16 Druckseiten) sein; Kurze Mitteilungen dürfen den Umfang von vier Druckseiten nicht überschreiten.

Das Manuskript muß leicht leserlich und einseitig geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern einzureichen, ebenso die Legenden. Die Arbeiten müssen knapp und sprachlich klar geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. *Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen* (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) *herzustellen.*

Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

Für die Rechtschreibung ist die „wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt.

Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch nach freier Wahl des Autors abgefaßt sein kann. Inhaltsverzeichnisse können nicht abgedruckt werden.

Von jeder Versuchsart bzw. von jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text, oder wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber zu umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen und angefordert werden kann.

Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige zu beschränken. Knappe Abbildungsunterschriften erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Unzulässig ist die doppelte Darstellung in Tabelle *und* Kurve. Für Halbtonbilder (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind reproduktionsfähige, d.h. scharfe, gut durchgezeichnete und tonwertreiche Vorlagen (Hochglanzabzüge) einzureichen. Die Beschriftung der Abbildungen mit Buchstaben und/oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise sind auf einem über die Vorlage geklebten Deckblatt einzureichen. Für schematische Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzungen reproduziert werden sollen, sind saubere, klare Skizzen abzuliefern, die vom Verlag umgezeichnet werden.

Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen mit vollständigem Titel der Arbeit, Zeitschriftentitel (in der Abkürzung nach den World Medical Periodicals), Band-, Seiten- und Jahreszahl. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen (jeweils mit Anfangsbuchstaben des Vornamens) *alphabetisch* anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammer gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und weniger wichtigen Teilen ist für Kleindruck vorzumerken. Autorennamen sollen (für KAPITÄLCHEN-Druck) doppelt, lateinische Namen der Objekte (für *Kursiv*-Druck) geschlängelt unterstrichen werden. In Kursiv-Druck können auch andere Worte des Textes gesetzt werden, die der Autor besonders hervorzuheben wünscht.

Das Zerlegen der Arbeit in mehrere Mitteilungen, um sie kürzer erscheinen zu lassen, ist unzulässig.

Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel nicht die gleichen sind.

Danksagungen können in Form von Fußnoten zum Beitragstitel oder als kurzer Petitabschnitt am Schluß der Arbeit gebracht werden. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

In der Korrektur sollen nur Druckfehler verbessert, jedoch keine inhaltlichen oder stilistischen Änderungen vorgenommen werden. 10% der Satzkosten übersteigende Korrekturkosten müssen den Autoren in Rechnung gestellt werden.

Flammenphotometrie

Von Dr. rer. nat. R. HERRMANN,

Privatdozent, Lehrbeauftragter für spektroskopische Verfahren in der Chemie, Gießen,

und Dr. C. TH. J. ALKEMADE,

o. Professor für Experimentalphysik am Physikalischen Institut der Universität Utrecht

Zweite, neubearbeitete Auflage

Mit 61 Textabbildungen und 74 Registrierkurven. VIII, 396 Seiten Gr.-8°. 1960.

Ganzleinen DM 88,—

INHALTSÜBERSICHT

Einleitung · Die Grundlagen · Meß-Methoden und -Apparate: Einrichtungen für die Unterhaltung der Flamme und das Zuführen der Analysensubstanzen. Die Optik und die Elektronik (Flammenphotometer mit Filtern. Flammenspektrophotometrie. Flammenspektrographie) · Zur Ausführung von Analysen · Fehlererkennung und -beseitigung: Blindwertstörungen. Die Emissionsbeeinflussungen durch Lösungspartner. Fehlerdiskussion · Anwendungen · Medizin und Zoologie · Anhang · Verzeichnis von Flammenlinien und -Banden zwischen 200—1000 mμ, alphabetisch nach dem Symbol der Elemente geordnet · Verzeichnis von Flammenlinien und -Banden zwischen 200—1000 mμ, diesmal nur nach Wellenlängen geordnet · Verzeichnis von Herstellern von Flammenphotometern · Literatur · Sachverzeichnis · Registrierkurven von Flammenspektren.

AUS DEN BESPRECHUNGEN DER ERSTEN AUFLAGE

„Die Monographie behandelt in vorbildlich klarer und übersichtlicher Weise die theoretischen Grundlagen und praktischen Probleme der Flammenphotometrie. Die Grenzen und Möglichkeiten der flammenphotometrischen Analyse werden ausführlich besprochen. Was speziell das medizinisch-biologische Anwendungsgebiet anbetrifft, so gehören die Ausführungen des Autors zum Besten, was in dieser Beziehung geschrieben worden ist. Das Buch, dessen Hauptgewicht bei der flammenphotometrischen Praxis liegt, wird von jedem analytisch tätigen Praktiker gerne und mit Nutzen zu Rate gezogen werden."

Schweizerische Medizinische Wochenschrift

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany